

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie  
Leiter Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt  
Klinikum der Universität  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Immunstimulatorische RNA-Oligonukleotide aktivieren  
T- und NK-Zellen über *Toll-like*-Rezeptor 7**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Laura Schmidt  
aus Heidelberg  
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Endres

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. J. Johnson

Mitberichterstatte: Prof. Dr. med. W. Zimmermann  
Prof. Dr. R. Issels

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: PD Dr. med. Dr. rer. nat. C. Bourquin

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2010

Gewidmet  
meiner Familie

---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 EINFÜHRUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 IMMUNITÄT UND IMMUNSURVEILLANZ.....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Typ-1 und Typ-2 Immunität .....	2
1.2.2 Konzept der Immunsurveillance bei der Tumorabwehr.....	3
1.2.2.1 Entstehung des Konzepts.....	3
1.2.2.2 Evidenz für das Konzept.....	3
1.2.2.3 Der Prozess der Immunsurveillance bei der Tumorabwehr.....	4
<b>1.3 ERKENNUNG VON NUKLEINSÄUREN DURCH <i>PATTERN-RECOGNITION</i>-REZEPTOREN .</b>	<b>5</b>
1.3.1 <i>Toll-like</i> -Rezeptoren .....	5
1.3.1.1 Physiologische Liganden.....	5
1.3.1.2 Signaltransduktion.....	7
1.3.1.3 Expressionsmuster Nukleinsäure-erkennender TLRs.....	9
1.3.2 Zytoplasmatische Rezeptoren.....	9
1.3.2.1 NLR-Proteine.....	10
1.3.2.2 RNA-Helikasen.....	10
<b>1.4 THERAPEUTISCHER EINSATZ VON SYNTHETISCHEN OLIGONUKLEOTIDEN UND TLR7- UND TLR8- LIGANDEN.....</b>	<b>11</b>
1.4.1 CpG als Adjuvans in Tierexperimenten .....	11
1.4.2 CpG in klinischen Studien .....	11
1.4.3 Synthetische TLR7- und TLR8-Liganden in Tierexperimenten .....	123
1.4.4 Synthetische TLR7- und TLR8-Liganden in klinischen Studien .....	13
<b>1.5 IMMUNSTIMULATORISCHE RNA .....</b>	<b>13</b>
1.5.1 Virale Einzelstrang-RNA.....	13
1.5.2 Von <i>short-interfering</i> RNA zu immunstimulatorischer RNA.....	14
<b>2. FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 OLIGONUKLEOTIDE.....</b>	<b>16</b>
3.1.1 Verwendete Sequenzen .....	16
3.1.2 Komplexierung und Verdünnung .....	17
<b>3.2 ZELLKULTUR .....</b>	<b>17</b>
3.2.1 Medien und Zusätze.....	17
3.2.2 Kulturbedingungen.....	18
3.2.3 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität .....	18
3.2.4 Verwendete Zelllinien.....	19

3.2.5	Kokulturen.....	19
<b>3.3</b>	<b>HERSTELLUNG VON EINZELZELLSUSPENSIONEN AUS MURINEM GEWEBE .....</b>	<b>20</b>
3.3.1	Gewinnung von Milzzellen.....	20
3.3.3	Generierung dendritischer Zellen aus Knochenmark.....	20
3.3.4	Isolierung und Aufreinigung von Zellpopulationen .....	21
<b>3.4</b>	<b>DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....</b>	<b>21</b>
3.4.1	Allgemeines Prinzip.....	21
3.4.2	Analyse der Zellaktivierung .....	23
3.4.3	Messung von intrazellulärem Interferon- $\gamma$ in T- und NK-Zellen .....	23
3.4.3.1	Interferon- $\gamma$ in NK-Zellen.....	23
3.4.3.2	Interferon- $\gamma$ in OVA-spezifischen T-Zellen.....	24
3.4.4	Ermittlung Antigen-spezifischer T-Zellen mittels MHC-I-Pentamer .....	24
<b>3.5</b>	<b>ZYTOTOXIZITÄTS-ASSAYS .....</b>	<b>25</b>
3.5.1	Bestimmung der <i>in vivo</i> -Zytotoxizität durch zytotoxische T-Zellen.....	25
3.5.2	Bestimmung der Zytotoxizität durch NK-Zellen.....	26
<b>3.6</b>	<b>ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA).....</b>	<b>26</b>
3.6.1	Zytokinmessung in Seren und Zellüberständen.....	26
3.6.2	Bestimmung von Immunglobulinen im Serum .....	27
<b>3.7</b>	<b>TIERVERSUCHE .....</b>	<b>28</b>
3.7.1	Mausstämme und Haltungsbedingungen .....	28
3.7.2	Genotypisierung von Mäusen mittels Polymerasekettenreaktion.....	28
3.7.2.1	DNA-Isolierung .....	28
3.7.2.2	Messung der DNA-Konzentration .....	28
3.7.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	29
3.7.2.4	Gelelektrophorese.....	29
3.7.3	Immunstimulation <i>in vivo</i> und Immunisierungen .....	30
3.7.4	Blutentnahme.....	30
3.7.5	Adoptiver Zelltransfer .....	31
3.7.6	Tumorversuche .....	31
3.7.6.1	Prophylaktische Immunisierungen.....	31
3.7.6.2	Tumorinduktion und Zielgrößen.....	31
3.7.6.3	Detektion tumorinfiltrierender NK-Zellen.....	32
<b>3.9</b>	<b>STATISTISCHE ANALYSE .....</b>	<b>32</b>
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>INDUKTION EINER T-ZELL-ANTWORT .....</b>	<b>33</b>
4.1.1	Aktivierung von Lymphozyten <i>in vivo</i> .....	33
4.1.2	Aktivierung lienaler und nodaler dendritischer Zellen <i>in vivo</i> .....	35

---

4.1.3	Erhöhung der Serumkonzentration proinflammatorischer Th1-Zytokine .....	35
4.1.4	Abhängigkeit der Lymphozytenaktivierung von dendritischen Zellen .....	37
4.1.4.1	Anwesenheit dendritischer Zellen als Voraussetzung für die Lymphozytenaktivierung.....	37
4.1.4.2	Induktion der Produktion von Interferon- $\gamma$ durch RNA-stimulierte dendritische Zellen.....	39
4.1.4.3	Aktivierung von Lymphozyten durch sezernierte Faktoren RNA-stimulierter dendritischer Zellen.....	41
4.1.5	TLR7-abhängige Zytokinproduktion .....	42
4.1.6	Induktion einer Antigen-spezifischen zytotoxischen Immunantwort .....	44
4.1.6.1	Entstehung einer IgG2a-Immunantwort.....	45
4.1.6.2	Synergistische Steigerung der Frequenz Antigen-spezifischer T-Zellen.....	47
4.1.6.3	Erhöhung der Funktionalität Antigen-spezifischer T-Zellen.....	48
4.1.6.4	Prophylaktische Immunisierung gegen Tumore.....	50
<b>4.2</b>	<b>INDUKTION EINER NK-ZELL-ANTWORT.....</b>	<b>52</b>
4.2.1	Induktion eines aktivierten NK-Zell-Phänotyps <i>in vivo</i> .....	52
4.2.2	TLR7-abhängige NK-Zell-Aktivierung <i>in vivo</i> .....	53
4.2.3	TLR7-abhängige Induktion der Zytotoxizität .....	53
4.2.4	Erhöhung des Anteils tumorinfiltrierender NK-Zellen .....	54
4.2.5	DC-vermittelte Aktivierung von NK-Zellen .....	55
4.2.5.1	Abhängigkeit der NK-Zell-Aktivierung von dendritischen Zellen.....	55
4.2.5.2	Aktivierung von NK-Zellen durch Zytokine dendritischer Zellen.....	57
4.2.5.3	Interleukin-12 als Schlüsselzytokin der RNA-vermittelten Interferon- $\gamma$ - Produktion.....	58
4.2.5.4	DC-vermittelte Aktivierung von NK-Zellen <i>in vivo</i> .....	59
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>62</b>
<b>5.1</b>	<b>IMMUNSTIMULATORISCHE RNA .....</b>	<b>62</b>
5.1.1	Administration .....	62
5.1.2	Rückgrat- und Sequenzabhängigkeit.....	63
5.1.3	RNA-erkennende Rezeptoren .....	64
<b>5.2</b>	<b>INDUKTION EINER ANTIGEN-SPEZIFISCHEN T-ZELL-ANTWORT .....</b>	<b>65</b>
5.2.1	„Bystander-Aktivierung“ von Lymphozyten .....	65
5.2.2	Antigen-spezifische Immunantwort.....	66
5.2.3	Regulation der zytotoxischen T-Zell-Antwort .....	67
<b>5.3</b>	<b>INDUKTION EINER NK-ZELL-ANTWORT.....</b>	<b>68</b>
5.3.1	NK-Zell-Aktivierung .....	68
5.3.2	Zelluläre und molekulare Mechanismen der NK-Zell-Aktivierung.....	69
<b>5.4</b>	<b>KLINISCHE RELEVANZ.....</b>	<b>71</b>

---

5.4.1	T-Zellen in der Tumormimmuntherapie .....	71
5.4.2	NK-Zellen in der Tumormimmuntherapie.....	71
5.4.3	Perspektive für den Einsatz immunstimulatorischer RNA.....	72
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>74</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>76</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>88</b>
8.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	88
8.2	PUBLIKATIONEN .....	91
8.3	LEBENS LAUF.....	93
8.4	DANKSAGUNG .....	94





# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Einführung

Schon Hippokrates postulierte um 400 v. Chr., dass der Körper eigene Heilungskräfte besitzt, die es bei der Therapie von Erkrankungen zu unterstützen gilt. Auch wenn er dabei noch nicht konkret das Immunsystem meinte, welches erst ab Ende des 18. Jahrhunderts durch Edward Jenner und später von Paul Ehrlich und Ilja Metschnikow entdeckt wurde, kann man dieses heute als einen wesentlichen Anteil dieser Selbstheilungskräfte betrachten. Zur Unterstützung dieses Systems bei der Bekämpfung von Pathogenen und Tumoren stellt die Immuntherapie ein vielversprechendes Mittel dar.

An dem Prozess der körpereigenen Abwehr von Pathogenen und Tumoren sind verschiedene Komponenten des Immunsystems beteiligt. Die direkte Elimination kann erfolgen durch Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), sowie durch Zellen des adaptiven (= erworbenen) Immunsystems, darunter T-Zellen und B-Zellen. Als Mittler zwischen angeborener und adaptiver Immunität können dendritische Zellen (DCs) fungieren. Wesentlicher Bestandteil zur Erkennung fremder Strukturen sind *Toll-like-Rezeptoren* (TLR), welche von den meisten Immunzellen exprimiert werden.

Das therapeutische Potential von DNA-Oligonukleotiden mit unmethyliertem CpG-Motiv, welche über Bindung an TLR9 die Lyse von Pathogenen und entarteten Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten induzieren, wurde bereits in tierexperimentellen Studien erwiesen [Krieg et al. 2002]. Erste klinische Studien zeigen vielversprechende Ergebnisse. Jedoch wird TLR9 von einer geringeren Zahl an humanen Zellpopulationen exprimiert als es im murinen System der Fall ist [Hornung et al. 2002; Kadowaki et al. 2001; Krug et al. 2001].

Kürzlich wurde beschrieben, dass immunstimulatorische Effekte auch durch virale einzelsträngige RNA (ssRNA) über TLR7 und TLR8 induziert werden können [Diebold et al. 2004; Heil et al. 2004]. In unserer Abteilung konnte interessanterweise gezeigt werden, dass sogenannte *short-interfering RNA* (siRNA) als Doppelstrang wie als Einzelstrang die Produktion von Interferon- $\alpha$  in plasmazytoiden dendritischen Zellen über TLR7 auslösen kann [Hornung et al. 2005]. Da TLR7 auf einer größeren Vielfalt an humanen Immunzellen exprimiert wird als TLR9, könnten sich große Vorteile für TLR7-Liganden in der klinischen Anwendung ergeben.

## 1.2 Immunität und Immunsurveillance

### 1.2.1 Typ-1 und Typ-2 Immunität

Bei der Abwehr von Pathogenen bedient sich das Immunsystem im Wesentlichen zweier Arme: der erworbenen, Antigen-spezifischen und der angeborenen Immunität. Eine weitere Einteilung unterscheidet eine Typ-1 von einer Typ-2 Immunität. Während die effektive Bekämpfung körperfremder und entarteter Strukturen vor allem durch die Typ-1 Immunität erfolgt, spielt die Typ-2 Immunität vor allem eine Rolle bei der Entstehung allergischer Prozesse. Da sich beide Immunantworten gegenseitig beeinflussen und inhibieren können, ist letztlich die Balance entscheidend, ob Pathogene abgewehrt werden. Die angeborene Typ-1 Immunität wird zum Einen von dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen vermittelt, die proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-12 (IL-12) und Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) produzieren. Zum Anderen sind IFN- $\gamma$ -produzierende NK- und NKT (Natürliche Killer T)-Zellen sowie  $\gamma\delta$ T-Zellen beteiligt. Diese begünstigen die Entstehung der erworbenen Typ-1 Antwort. Bei dieser werden aus CD4<sup>+</sup> T-Helfer (Th)-Zellen Th1-Zellen, die durch IFN- $\gamma$ -Freisetzung die Bildung Antigen-spezifischer, zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen und damit eine zelluläre Immunabwehr induzieren. Th2-Zellen entstehen dabei im Milieu von Zytokinen wie IL-4 und IL-10 und induzieren sowohl die Bildung von IL-4 produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen als auch die Differenzierung von Plasmazellen und damit eine humorale Immunantwort. Je nach Zytokinmilieu können aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen auch andere Zellen entstehen, die an der Inhibierung der zellulären Antwort beteiligt sind. So differenzieren CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  (*tumour growth factor  $\beta$* ) zu T-regulatorischen Zellen (Treg), welche CD8<sup>+</sup> T-Zellen supprimieren [Disis et al. 2009; Ikeda et al. 2004]. In Anwesenheit von TGF- $\beta$  und zusätzlich IL-6 und IL-23 können CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Th17-Zellen differenzieren, die zwar proinflammatorisch wirken, jedoch aber eine effektive antitumorale T-Zell-Antwort unterdrücken [Bettelli et al. 2008; Steinmann 2007; Langowski et al. 2006]. Darüber hinaus wurde eine heterogene Population von Suppressorzellen myeloiden Ursprungs (MDSC) entdeckt, welche ebenfalls die Abwehr körperfremder und entarteter Strukturen inhibieren [Movahedi et al. 2008; Huang et al. 2006; Serafini et al. 2006].

## 1.2.2 Konzept der Immunsurveillance bei der Tumorabwehr

### 1.2.2.1 Entstehung des Konzepts

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts vermutete Paul Ehrlich anhand von Tierversuchen, dass entartete Zellen vom Immunsystem erkannt und bekämpft werden bevor sie als Tumoren klinisch manifest werden [Ehrlich 1909]. Etwa 50 Jahre später entwickelten Thomas und Burnet ein Konzept, das von der Existenz tumorspezifischer Antigene ausging, welche entscheidend für die Unterdrückung des Tumorwachstums durch das Immunsystem sind [Burnet 1957; Thomas 1959; Burnet 1971]. Dieses Konzept der sogenannten Immunsurveillance basierte auf Experimenten, bei denen transplantierte Tumoren aus genetisch identischen Mäusen immunologisch abgestoßen wurden. Nachdem Beobachtungen anderer Gruppen diese Erkenntnisse jedoch nicht belegen konnten, wurde das Konzept zunächst bezweifelt. Erst in den 90er Jahren unterstützten Experimente das Konzept, und die Idee der Immunsurveillance begann sich zu etablieren [Kim et al. 2007].

### 1.2.2.2 Evidenz für das Konzept

Bei der Überprüfung der Hypothese der Immunsurveillance, gingen mehrere Arbeitsgruppen zunächst der Frage nach, ob immundefiziente Tiere ein vermehrtes Tumorwachstum entwickeln würden. Sie verwendeten dabei neonatal thymektomierte oder thymusdefiziente Mäuse und verglichen deren Tumorwachstum mit Kontrollmäusen. Jedoch ergaben sich dabei keine einheitlichen Ergebnisse, die die These hätten untermauern können. Erst Versuche mit RAG2<sup>-/-</sup> (Rekombination-aktivierendes Gen) Mäusen, welche nicht über funktionsfähige NKT-, T- und B-Zellen verfügen, konnten diesen Zellen eine Rolle bei der Tumorabwehr zuschreiben. Diese Mäuse entwickelten signifikant schneller induzierte sowie auch mehr spontane Tumoren [Dunn et al. 2002]. Zahlreiche Versuche mit Knockout-Tieren und Zelldepletionen *in vivo* folgten und belegten für verschiedene Immunzellen und Zytokine die Beteiligung an der Tumorabwehr. Auch klinische Studien konnten dies belegen. So beobachtete man in mehreren Studien, dass immunsupprimierte Patienten nach Transplantation, ein höheres Risiko für die Bildung verschiedener Neoplasien nicht-viralen Ursprungs hatten (wobei jedoch eine mögliche Korrelation zu den verwendeten Immunsuppressiva nicht ausgeschlossen wurde). Darüber hinaus stellte man fest, dass die Dichte tumorinfiltrierender T-Lymphozyten und NK-Zellen mit der Prognose und dem Überleben bei verschiedenen Karzinomen positiv korrelierte [Kim et al. 2007; Dunn et al. 2002].

### 1.2.2.3 Der Prozess der Immunsurveillance bei der Tumorabwehr

Neben DNA-Reparaturmechanismen und Apoptoseinduktion gilt die Immunsurveillance heute als anerkannter Prozess bei der Abwehr von Tumoren und liefert Erklärungsansätze für die Resistenzentwicklung von Tumoren gegenüber den immunologischen Abwehrmechanismen. Der Prozess besteht aus den drei Phasen Elimination, Equilibrium und *Escape*.

Die Eliminationsphase wiederum kann in 4 Schritte unterteilt werden:

- 1) Proliferierende entartete Zellen setzen proinflammatorische Signale frei, die Zellen der angeborenen Typ-1 Immunität rekrutieren. Darunter sind Makrophagen und DCs, welche IL-12 und IFN- $\alpha$  produzieren, sowie tumorinfiltrierende NK-, NKT- und  $\gamma\delta$ T- Zellen, welche IFN- $\gamma$  produzieren. IFN- $\gamma$  hat dabei nicht nur einen Effekt auf zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen sondern wirkt darüber hinaus direkt antiproliferativ, antiangiogenetisch und proapoptotisch auf Tumorzellen. Das von dendritischen Zellen produzierte IFN- $\alpha$  scheint vielmehr eher eine indirekte Wirkung auf Tumorzellen aus zu üben. Es aktiviert weitere dendritische Zellen und Makrophagen und erhöht das Überleben von T-Zellen sowie die zytolytische Aktivität von NK-Zellen [Dunn et al. 2006].
- 2) DCs reifen unter proinflammatorischen Bedingungen nach Phagozytose von Tumorzellen und migrieren zu den drainierenden Lymphknoten.
- 3) Reife DCs vermitteln dort zwischen der angeborenen und erworbenen Immunität, indem sie T-Zellen Tumorantigene präsentieren und Antigen-spezifische T-Zellen generieren.
- 4) Die Antigen-spezifischen T-Zellen wandern in die Tumorregion und eliminieren die Tumorzellen unter Produktion von IFN- $\gamma$ . Die Elimination der Tumorzellen wird unterstützt durch die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen, welche den Kontakt mit akzessorischen Zellen bzw. deren Zytokine und den anschließenden Kontakt mit Zielzellen erfordert.

Im Equilibrium, das als Jahre dauernde Phase angenommen wird, stellt sich eine Art Gleichgewicht zwischen Tumor- und Immunzellen ein. Unter den Tumorzellen bilden sich durch Selektion immer mehr Zellen, die gegen die Abwehrmechanismen des Immunsystems resistent sind. Schließlich gelingt es diesen Tumorzellen der Immunabwehr zu entkommen (*Escape*). Dazu führen zum einen vom Tumor gebildete lösliche Faktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*), IL-10, TGF- $\beta$  und Fas-Ligand (FasL), welcher die Apoptose von tumorinfiltrierenden Lymphozyten einleitet [Igney und Krammer 2005], sowie die Herunterregulation von Tumorantigenen, was zur Ignoranz und sogar Toleranz durch das Immunsystem führt. Zum anderen scheinen die tumorinfiltrierenden T-Zellen die Funktion ihres T-Zell-Rezeptors zu verlieren und

zusätzlich von T regulatorischen Zellen und MDSC inaktiviert zu werden [Ostrand-Rosenberg 2008 und 2009; Kim et al. 2007].

### 1.3 Erkennung von Nukleinsäuren durch *Pattern-recognition*-Rezeptoren

Zur Erkennung von Pathogenen bedient sich das angeborene Immunsystem sogenannter *Pattern-recognition*-Rezeptoren (PRR), welche im Gegensatz zu den Rezeptoren des adaptiven Immunsystems, in der Keimbahn festgelegt und wenig spezifisch sind. Sie besitzen gemeinsame charakteristische Eigenschaften. Das Expressionsmuster der Rezeptoren ergibt sich nicht durch klonale Selektion, sondern alle Zellen einer Subpopulation exprimieren Rezeptoren gleicher Spezifität. Dies ist auch unabhängig vom immunologischen Gedächtnis. PRR erkennen bestimmte mikrobielle Strukturen, die auch als *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP) bezeichnet werden, und induzieren dabei antipathogene Antworten über spezifische Signaltransduktionswege. Zu den bislang bekannten PRR, die virale, bakterielle oder synthetische Nukleinsäuren erkennen, gehören vor allem *Toll-like*-Rezeptoren, die Proteinkinase PKR sowie zytoplasmatische RNA-Helikasen und NLR-Proteine (*nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like proteins*) [Kawai und Akira 2008].

#### 1.3.1 *Toll-like*-Rezeptoren

*Toll-like*-Rezeptoren sind evolutionär hoch konservierte Moleküle, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit *Toll* identifiziert wurden, welches zunächst als wichtiges Genprodukt für die dorsoventrale Ausrichtung von *Drosophila* in der Embryonalentwicklung beschrieben wurde [Trinchieri und Sher 2007; Medzhitov und Janeway 2000 und 2002]. Später konnte *Toll* auch eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von Infektionen mit Pilzen und gram-positiven Bakterien in *Drosophila* zugeschrieben werden [Lemaitre et al. 1996 und 2004]. Als erster funktioneller *Toll-like*-Rezeptor, der eine angeborene Immunantwort vermittelt, wurde TLR4 identifiziert [Poltorak 1998, Hoshino 1999].

##### 1.3.1.1 Physiologische Liganden

Inzwischen sind 13 TLRs bekannt, wobei der murine TLR8 und der humane TLR11 nicht funktional sind [Kawai und Akira 2008; Lee und Kim 2007; Akira et al. 2006]. Tabelle 1 zeigt die Liganden für TLR1 bis TLR11, wobei über die Liganden für TLR10 bis 13 noch keine ausreichenden Daten vorliegen. Nukleinsäuren werden von TLR 3, 7, 8 und 9 erkannt (in der Tabelle hervorgehoben). Dabei erkennt TLR3 lange doppelsträngige RNA

(dsRNA) mit mehr als 30 Nukleotiden, die als Zwischenprodukt bei der Replikation bestimmter Viren entsteht [Alexopoulou et al. 2001]. TLR7 und 8 binden einzelsträngige RNA (ssRNA) von ssRNA-Viren [Diebold et al. 2004; Heil et al. 2004]. Bakterielle und virale DNA, die unmethylierte CpG-Motive enthält, ist Ligand für TLR9 [Hemmi et al. 2000; Krug et al. 2004].

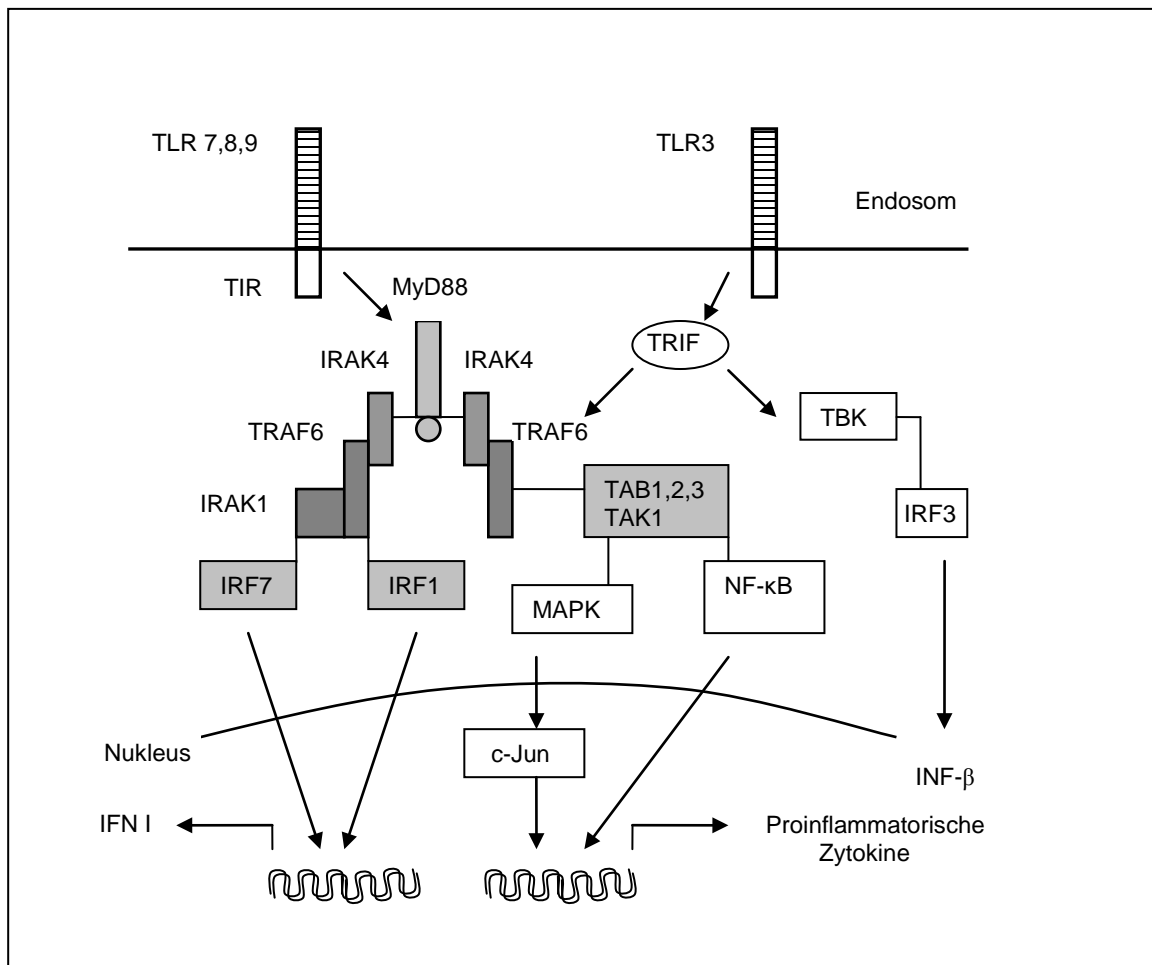
TLR	PAMP	Spezies	Referenz
TLR1	Lipoproteine Peptidoglykan Lipoteichonsäure	Gram-positive Bakterien	[Alexopoulou et al. 2002]
TLR2	Lipoarabinomannan	Mykobakterien	[Underhill et al. 1999]
TLR6	Phospholipomannan Zymosan Haemagglutinin	Candida albicans Hefen Masern-Virus	[Netea et al. 2004] [Ozinsky et al. 2000] [Bieback et al. 2002]
TLR4	LPS  Mannan Virale Hüllproteine Glycoinositolphospholipide Fibrinogen	Gramnegative Bakterien  Candida albicans RSV Trypanosoma cruzi	[Poltorak et al. 1998, Hoshino et al. 1999]  [Netea et al. 2004] [Kurt-Jones et al. 2000] [Oliveira et al. 2004] [Smiley et al. 2001]
TLR5	Flagellin	Bakterien	[Hayashi et al. 2001]
<b>TLR3</b>	<b>dsRNA</b>	Viren	[Alexopoulou et al. 2001]
<b>TLR7</b> <b>TLR8</b>	<b>ssRNA</b>	Viren	[Hemmi et al. 2002; Heil et al. 2004; Diebold et al. 2004; Lund et al. 2004; Hornung et al. 2005]
<b>TLR9</b>	<b>DNA (CpG-Motive)</b>	Bakterien, Viren	[Hemmi et al. 2000; Krug et al. 2004]
TLR10	Nicht bekannt	Nicht bekannt	[Hasan et al. 2005]
TLR11	Nicht bekannt  Profilin-ähnliches Molekül	Uropathogene Bakterien Toxoplasma gondii	[Zhang et al. 2004] [Yarovinski et al. 2005 und 2008]
TLR12	Nicht bekannt	Nicht bekannt	[West et al. 2006]
TLR13	Nicht bekannt	Nicht bekannt	[West et al. 2006]

**Tab. 1** Liganden der *Toll-like-Rezeptoren*

### 1.3.1.2 Signaltransduktion

TLRs sind Transmembranproteine des Typ I, welche N-terminal Leucin-reiche Sequenzabschnitte besitzen, die die Erkennung von Liganden vermitteln. Die Signaltransduktion wird initiiert durch einen zytosolischen Abschnitt, bestehend aus einer Domäne homolog zu *Toll* und Interleukin-1-Rezeptor (TIR-Domäne). Nach Bindung eines Liganden rekrutieren TLRs Adaptermoleküle, darunter MyD88 (myeloider Differenzierungsfaktor 88), TIRAP (TIR-assoziiertes Protein), TRIF (TIR *domain containing adapter protein inducing Interferon- $\beta$* ) sowie TRAM (TRIF *related adapter molecule*). MyD88 wird von den meisten TLRs - mit Ausnahme von TLR3, welcher TRIF verwendet - als Adapterprotein eingesetzt, und vermittelt durch Interaktionen mit weiteren Molekülen einerseits die Bildung von NF- $\kappa$ B (nukleärer Faktor  $\kappa$ B) und proinflammatorischen Zytokinen und andererseits die Bildung von Typ I Interferonen (IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ). Abbildung 1 zeigt in vereinfachter Darstellung die Signalkaskade der Nukleinsäure-erkennenden TLRs 3, 7, 8 und 9. Diese sind im Gegensatz zu den anderen TLRs intrazellulär im endosomalen Kompartiment lokalisiert und erkennen ihre Liganden erst nach deren Aufnahme in die Zelle. Da nur fremde Nukleinsäuren in das Endosom aufgenommen werden, nicht jedoch intrazelluläre körpereigene, gelingt damit unter normalen Bedingungen die Unterscheidung zwischen fremden und körpereigenen Nukleinsäuren [Iwasaki und Medzhitov 2004].

Zu den Signalwegen der anderen TLRs bestehen geringe Unterschiede. So verläuft zum Beispiel die Signaltransduktion von TLR2 außer über MyD88 auch über TIRAP und die von TLR4 über alle vier Adaptermoleküle [Kawai und Akira 2008].



**Abb. 1 Signaltransduktion durch Nukleinsäure-erkennende TLRs.** Nach Bindung des Liganden interagiert das Adaptermolekül MyD88 mit IRAK4 (IL-1-R- assoziierte Kinase) und TRAF6 (TNF-Rezeptor-assoziierter Faktor 6), welches mittels Ubiquitinierung die TAK1-Kinase (TGF-β-aktivierte Kinase) aktiviert. Zusammen mit den TAK-bindenden Proteinen TAB1, 2, 3 induziert TAK1 die Degradation von IκB (Inhibitor von κB) und ermöglicht damit die Translokation von NF-κB in den Zellkern. Daneben werden auch MAP-Kinasen aktiviert, die wiederum eine c-Jun-Kinase aktivieren. Dieser Signalweg kontrolliert die Expression von Genen, die für die Produktion proinflammatorischer Zytokine notwendig sind. Daneben kann MyD88 mittels IRAK4 und TRAF6 auch mit IRAK1 interagieren, was zur Translokation von IRF7 (IFN-regulierender Faktor) in den Zellkern führt. Dort reguliert der Transkriptionsfaktor IRF7 die Expression von Genen, die für Typ I Interferone codieren. Der TLR3-Signaltransduktionsweg mündet über TRIF entweder in der Induktion von MAPK mittels Aktivierung von TRAF6, TAK und TAB oder in der IFN-β-Produktion durch Rekrutierung von TBK (TRAF family member-associated NF-κB-bindende Kinase) und IRF3.



### 1.3.1.3 Expressionsmuster Nukleinsäure-erkennender TLRs

Das Expressionsmuster der TLRs sowie deren Reagibilität unterscheidet sich sowohl zwischen Geweben und Zellpopulationen als auch zwischen Spezies. Darüber hinaus kann sich die Expression eines TLRs auch innerhalb einer Zellpopulation unterscheiden. So wird die Expression eines TLRs moduliert durch Exposition mit Pathogenen und Zytokinen sowie durch andere TLRs. Das heißt, die Expression ist ein dynamischer Prozess [Hopkins und Sriskandan 2005; Trinchieri und Sher 2007].

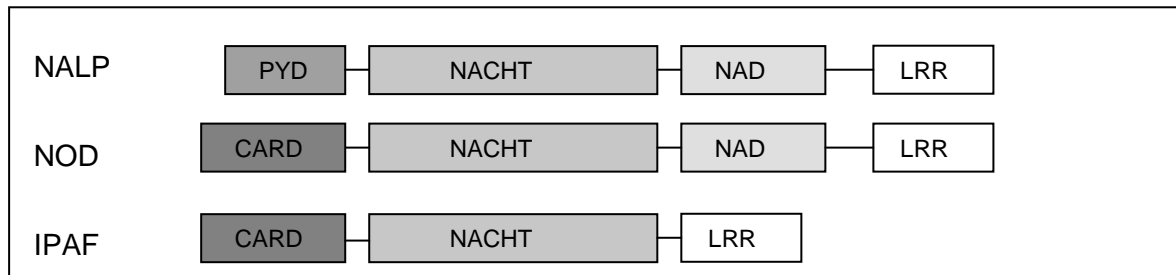
TLR3 ist funktional sowohl in murinen als auch in humanen myeloiden DCs (mDC), sowie zusätzlich in Zellen des zentralen Nervensystems, Astrozyten und Mikroglia, wo TLR3 eine entscheidende Rolle bei der Abwehr viraler Infektionen zu spielen scheint [Barchet et al. 2008]. Während alle murinen DC-Subpopulationen sowie B-Zellen funktionsfähige TLR9 besitzen, ergibt sich für humane Zellen ein eingeschränkteres Expressionsmuster [Iwasaki und Medzhitov 2004]. mRNA für TLR9 wurde nur in humanen plasmazytoiden DCs (pDC) und B-Zellen gefunden, welche auch sensitiv für den Liganden CpG sind. Dagegen wird TLR9 nicht in ausreichendem Maße von humanen Monozyten, mDCs und NK-Zellen exprimiert [Krug et al. 2001; Hornung et al. 2002]. TLR8 ist in murinen Zellen nicht funktional, in humanen Zellen teilen sich jedoch TLR7 und TLR8 die Erkennung einzelsträngiger RNA. Diese sind in B-Zellen, pDCs und –im Gegensatz zu TLR9– auch in humanen Monozyten und mDCs funktional [Bekeredjian-Ding et al. 2006 und 2005]. Für NK-Zellen gibt es keine einheitlichen Hinweise dafür, ob funktionsfähige TLR7 und TLR8 exprimiert werden [Hornung et al. 2002; Sivori et al. 2004; Hart et al. 2005; Toka et al. 2009]. Für T-Zellen gibt es Daten, die zeigen, dass humane T-regulatorische Zellen (Treg) TLR8 exprimieren, wobei die Stimulierung die Treg-Funktion umkehrt. Murine T-regulatorische Zellen exprimieren dagegen kein TLR7. Aktivierung des Rezeptors führt hier indirekt über dendritische Zellen zur Inhibierung der T-regulatorischen Zellen [Anz et al. 2009]. Humane CD4- und CD8-positive T-Zellen weisen TLR9 auf [Sutmoller et al. 2006].

### 1.3.2 Zytoplasmatische Rezeptoren

Auch TLR-unabhängig können Nukleinsäuren von Pathogenen vom angeborenen Immunsystem erkannt werden. Dies geschieht über zytoplasmatische Rezeptoren, die sich in zwei Gruppen unterteilen lassen: die RNA-Helikasen und die Gruppe der NLR(NOD-*like*-Rezeptor)-Proteine. Während RNA-Helikasen virale RNA erkennen, sind NLR-Proteine hauptsächlich an der Erkennung bakterieller Komponenten wie  $\gamma$ -D-Glutamyl-Meso-Diaminopimelinsäure (iE-DAP), Muramyl-dipeptid und bakterieller RNA beteiligt.

### 1.3.2.1 NLR-Proteine

Zu den NLR-Proteinen gehören unter anderem NOD (Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne)-Proteine, die eine Caspase-rekrutierende Domäne (CARD) besitzen, sowie NALPs (NACHT-, LRR- und Pyrin-Domänen-enthaltendes Protein) und IPAF (ICE (=IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-Proteasen-aktivierender Faktor) (Struktur s. Abb. 2).



**Abb. 2 Proteine der NLR- Familie.** Die Proteine bestehen aus der Nukleotid-bindenden Domäne NACHT, an die sich eine NACHT-assoziierte Domäne (NAD) oder direkt ein *Leucin-rich repeat* (LRR) anschließt. NOD und IPAF beinhalten eine CARD-Domäne, während NALP eine Pyrin-Domäne (PYD) enthält.

Die Signalkaskade führt zur Aktivierung der Caspase-1 mittels Rekrutierung des sogenannten Inflammasoms, einem Komplex aus mehreren Proteinen. Caspase-1 induziert die Bildung von IL-1 $\beta$ . Ein alternativer Weg führt über die Kinase RICK (Rezeptor-interagierende Serin-Threonin Kinase) zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und damit zur Bildung proinflammatorischer Zytokine [Ye und Ting 2008; Akira et al. 2006].

### 1.3.2.2 RNA-Helikasen

Zu den zytoplasmatischen Rezeptoren, die RNA-Helikasen enthalten, gehört das zuerst identifizierte RIG-I (Retinsäure-induziertes Gen I) und die nachfolgend entdeckten RIG-I-like-Rezeptoren MDA-5 (*melanoma differentiation associated gene 5*) und LGP-2 (*laboratory of genetics and physiology 2*). RIG-I und MDA-5 wurden das erste Mal im Jahr 2004 als RNA-erkennende Moleküle beschrieben [Yoneyama et al. 2004, Andrejeva et al. 2004]. Sie besitzen beide jeweils zwei CARD-like Domänen und eine RNA-Helikase, welche für die Interaktion mit viraler RNA benötigt wird. Für die RIG-I-vermittelte Detektion von RNA-Molekülen konnte gezeigt werden, dass das 5`Triphosphat-Ende der RNA, das durch virale Polymerasen gebildet wird, von entscheidender Bedeutung ist und direkt von RIG-I gebunden wird [Hornung et al. 2006; Pichlmair et al. 2006]. Die Erkennung von RNA führt mittels IPS-1 (IFN- $\beta$  Promotor-Stimulator) und TBK1 zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und IRF3 und damit zur Bildung von IFN- $\beta$  und proinflammatorischen Zytokinen. LGP-2 besitzt

keine CARD-like Domäne und scheint eine Rolle bei der Regulation von RIG-I und MDA-5 zu spielen [Kawai und Akira 2008].

Es gibt Hinweise, dass TLRs zum Einen untereinander [Wang et al. 2006, Bekeredjian-Ding et al. 2006] und zum Anderen mit den zytoplasmatischen Rezeptoren bei der Immunantwort gegen Pathogene kooperieren [Trinchieri und Sher 2007].

## 1.4 Therapeutischer Einsatz von synthetischen Oligonukleotiden und TLR7- und TLR8- Liganden

### 1.4.1 CpG als Adjuvans in Tierexperimenten

Der immunstimulierende Effekt von TLR-Liganden führte zu der Idee, diese (in synthetischer Form) als Vakzine zu verwenden. Für synthetische DNA mit CpG-Motiven ist die immunstimulierende Wirkung im murinen System bereits gut untersucht. In Tierexperimenten zeigte sich, dass CpG-Oligonukleotide die Bildung proinflammatorischer Th1-Zytokine induzieren und eine vorübergehende Resistenz gegen Infektionen mit Pathogenen wie z. B. *Listeria monocytogenes* [Krieg et al. 1998] oder Leishmanien [Zimmermann et al. 1998] vermitteln können. Bei Anwendung von CpG-Oligonukleotiden zusammen mit einem Antigen wurde ebenfalls die Induktion einer Th1-Immunität [Chu et al. 1997, Roman et al. 1997] und darüber hinaus die Unterdrückung einer Th2-Antwort [Trujillo-Vargas et al. 2005] beobachtet. Im direkten Vergleich mit anderen adjuvanten Vakzinen zeigten sich CpG-Oligonukleotide überlegen bei der Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort [Kim et al. 2000] und gleichzeitig weniger toxisch als *Complete Freund's adjuvant* (CFA) [Weeratna et al. 2000], welches als Goldstandard gilt. Eine kombinierte Immunisierung mit dendritischen Zellen und CpG führte zur Regression induzierter muriner Kolontumore und Lymphome [Heckelsmiller et al. 2002, Lonsdorf et al. 2003], wobei gezeigt wurde, dass CpG die Toxizität einer Chemotherapie mindern und deren Wirkung steigern kann [Bourquin und Schreiber et al. 2006; Van der Most et al. 2006; Wang et al. 2005; Weigel et al. 2003].

### 1.4.2 CpG in klinischen Studien

Für das humane Immunsystem ist beschrieben, dass CpG-Oligonukleotide unter anderem die Produktion von Th1-Zytokinen in pDCs [Krug et al. 2001] sowie die Bildung einer CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelten zytotoxischen Antwort *in vitro* induzieren [Rothenfusser et al. 2004]. Erste klinische Studien setzten CpG erfolgreich als adjuvante Vakzine bei der Immunisierung gegen Hepatitis B ein [Halperin et al. 2003, Cooper et al. 2004]. Im

Bereich der Tumorimmuntherapie zeigten sich in ersten klinischen Studien bei Tumorpatienten erhöhte Spiegel proinflammatorischer Zytokine bzw. erhöhte Zahlen an NK-Zellen oder zytotoxischen T-Zellen, jedoch insgesamt nur eine moderate antitumorale Wirkung. Es ließen sich bei Anwendung von CpG als Monotherapie bei Patienten mit kutanen Lymphomen vermehrt aktivierte NK-Zellen und CD8-positive T-Zellen nachweisen [Wysocka et al. 2004]. Auch bei Melanompatienten zeigte sich eine vermehrte Freisetzung inflammatorischer Zytokine sowie eine Reduktion der Zahl an T-regulatorischen Zellen [Molenkamp et al. 2007]. Eine kombinierte Immunisierung von CpG mit Proteinen führte bei Melanompatienten zu einer Expansion an antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen [Speiser et al. 2005]. Erste Phase III Studien bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom zeigten jedoch keinen Nutzen von CpG in einer Kombinationstherapie mit Gemcitabin/Cisplatin und mussten wegen Nebenwirkungen vorzeitig beendet werden [Krieg 2008]. Bezüglich des therapeutischen Nutzens von CpG bei Tumorpatienten gilt es, die Ergebnisse weiterer klinischer Studien abzuwarten.

Bei der Übertragung der Ergebnisse aus den Tierversuchen in klinische Studien ist das restriktive Expressionsmuster von TLR9 in humanen Immunzellen zu beachten. Wie oben beschrieben, wird TLR9 im Gegensatz zum murinen System beim Menschen nur von B-Zellen und pDCs exprimiert, nicht jedoch von antigen-präsentierenden Zellen wie myeloiden DCs oder Monozyten, die entscheidend zur Entstehung einer Immunantwort gegen virale oder tumorassoziierte Antigene beitragen [Banchereau und Steinman 1998].

#### 1.4.3 Synthetische TLR7- und TLR8-Liganden in Tierexperimenten

Zu den synthetischen Liganden für TLR7 und TLR8 gehören die Imidazoquinolin-Komponenten Imiquimod (R837, 1-(2-Methylpropyl)-1*H*-Imidazol[4,5-*c*]Quinolin-4-Amin), Resiquimod (R848, 4-Amino-2-(Ethoxymethyl)-*a,a*-Dimethyl-1*H*-Imidazol[4,5-*c*]Quinolin-1-Ethanol) und Gardiquimod (1-(4-Amino-2-Ethylaminmethylimidazo-[4,5-*c*]Quinolin-1-yl)-2-methylpropan-2-ol) sowie Nukleosidanaloga wie Loxoribin. Die am besten untersuchten synthetischen Liganden sind die Imidazoquinolin-Komponenten. Für diese Liganden wurde in Tierexperimenten gezeigt, dass sie eine antivirale Wirkung besitzen, die vor allem durch die Induktion der IFN- $\alpha$ -Produktion in DCs vermittelt wird [Harrison et al. 1988; Reiter et al. 1994]. Des Weiteren wurde diesen Komponenten eine antitumorale Wirkung gegenüber murinen Kolontumoren, Bronchialkarzinomen und Sarkomen zugeschrieben [Sidky et al. 1992].

#### 1.4.4 Synthetische TLR7- und TLR8-Liganden in klinischen Studien

Auch in humanen PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) wurde in der Anwesenheit von Imiquimod eine erhöhte Interferon-Freisetzung beobachtet. In klinischen Studien erwies sich Imiquimod -unter dem Namen Aldara<sup>TM</sup>- bei der topischen Behandlung von Genitalwarzen als therapeutisch wirksamer als Plazebo [Edwards et al. 1998]. Aldara<sup>TM</sup> ist heute zugelassen für die Behandlung von Condylomata acuminata, wird aber als *off-label-use* auch zur Behandlung anderer viraler Hauterkrankungen verwendet. Weitere Studien zeigten einen positiven Effekt von Imiquimod bei der Behandlung von Hauttumoren, vor allem des Basalzellkarzinoms [Bath-Hextall et al. 2004]. Der Wirkmechanismus wird dabei vor allem auf die TLR7- und TLR8-vermittelte Induktion einer proinflammatorischen Zytokinbildung sowie auch auf einen proapoptotischen Effekt zurückgeführt [Schön und Schön 2008].

### 1.5 Immunstimulatorische RNA

#### 1.5.1 Virale Einzelstrang-RNA

Eine erste Reaktion auf virale Infektionen ist die Produktion von IFN- $\alpha$  durch dendritische Zellen. Bei der Frage, wie diese Reaktion vermittelt wird, konnten im Jahr 2004 Diebold et al. zeigen, dass für die Entstehung der Immunantwort auf Infektionen mit Influenzavirus die TLR7-abhängige Erkennung einzelsträngiger RNA verantwortlich ist. Sie beobachteten, dass sowohl lebende als auch inaktivierte Influenzaviren, die die Fähigkeit zur Replikation und damit zur Bildung doppelsträngiger RNA nicht besitzen, in murinen pDCs die Produktion von IFN- $\alpha$  induzieren. Während TLR9<sup>-/-</sup> und TLR3<sup>-/-</sup> DCs eine normale IFN- $\alpha$ -Antwort zeigten, wurde die IFN- $\alpha$ -Produktion in MyD88- und TLR7-defizienten Zellen unterbunden [Diebold et al. 2004]. Ähnliche Ergebnisse beobachteten Lund et al. für einen anderen ssRNA-Virus, nämlich VSV (*vesicular stomatitis virus*) [Lund et al. 2004]. Eine Sequenzabhängigkeit wurde dabei bis dahin nicht beobachtet. Heil et al. zeigten, dass einzelsträngige RNA von HIV-1 mit GU-Motiven, humane myeloide und plasmazytoide dendritische Zellen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine mittels TLR7 und TLR8 aktiviert [Heil et al. 2004].

### 1.5.2 Von *short-interfering* RNA zu immunstimulatorischer RNA

In unserer Abteilung wurde interessanterweise beobachtet, dass auch bestimmte doppelsträngige RNA-Sequenzen, die in der RNA-Interferenz-Technologie eingesetzt werden, unabhängig von ihrem GU-Gehalt die Produktion von IFN- $\alpha$  in pDCs induzieren. Es handelt sich dabei um sogenannte *short-interfering* RNA (siRNA), kurze doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) bestehend aus 19 bis 21 Basenpaaren, die die Aktivität der zu ihrer Sequenz homologen Gene unterbinden. Diese RNA-Interferenz tritt natürlicherweise post-transkriptionell zur Genregulation auf. Lange dsRNA, wie sie auch während der Virusreplikation auftritt, wird als Warnsignal interpretiert und kann zur IFN- $\alpha$ -Freisetzung führen, ein für die siRNA-Technologie unerwünschter Effekt. Von den siRNA-Molekülen wurde jedoch angenommen, dass sie aufgrund ihrer geringen Größe keine unspezifischen systemischen Reaktionen auslösen können. Als in unserer Abteilung siRNA-Sequenzen zur Herunterregulation der TLR9-Gen-Aktivität etabliert wurden, fiel jedoch erstaunlicherweise auf, dass nicht die langen dsRNA-Kontrollmoleküle, sondern ausgerechnet die kleinen siRNA-Oligonukleotide sequenzabhängig die Produktion von IFN- $\alpha$  in murinen und humanen pDCs induzieren. Die gleichen immunstimulatorischen Effekte, für die TLR7 als Mediator identifiziert werden konnte, wurden mit den korrespondierenden Einzelsträngen beobachtet. Die zusätzliche immunstimulatorische Wirkung von isRNA führte damit zur Bezeichnung isRNA (immunstimulatorische RNA). Als besonders immunstimulierend erwies sich eine Sequenz bestehend aus neun Basen (GUCCUCAA) [Hornung et al. 2005]. Diese wurde für die vorliegende Arbeit mit doppeltem Motiv verwendet.

## 2. FRAGESTELLUNG

Zwei wesentliche Komponenten der effektiven Abwehr von Pathogenen und Tumoren durch das Immunsystem sind die Antigen-spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort sowie die angeborene NK-Zell-Antwort. Ziel der Immuntherapie ist es, diese Abwehrmechanismen zu stärken. So führte der immunstimulierende Effekt von *Toll-like*-Rezeptor-Liganden zu deren Einsatz als Vakzine. Insbesondere die Verwendung synthetischer CpG-DNA, Ligand für TLR9, zeigte im murinen System vielversprechende Erfolge bei der Immuntherapie von Tumoren. Die Ergebnisse ließen sich jedoch bislang nur bedingt auf das humane System übertragen. Es ist bekannt, dass TLR9 in humanen Zellen ein eingeschränktes Expressionsmuster aufweist. Somit ist es von Interesse TLR-Liganden zu untersuchen, deren Rezeptor auch von humanen Zellen ausreichend exprimiert wird. Dies ist für TLR7 der Fall. Nachdem in unserer Abteilung beobachtet wurde, dass RNA-Moleküle durch Interaktion mit TLR7 in dendritischen Zellen die Produktion von Interferon- $\alpha$  induzieren können, war es Ziel dieser Arbeit, das immunstimulatorische Potenzial von RNA-Oligonukleotiden im murinen System genauer zu charakterisieren. Es sollte untersucht werden, ob RNA-Oligonukleotide sequenzabhängig über TLR7 die Entstehung einer T-Zell- und NK-Zell-Antwort induzieren und damit als potenzielle neue adjuvante Vakzine für die Immuntherapie geeignet sein könnten.

Es sollten sowohl in geeigneten *in vitro*- als auch *in vivo*-Modellen folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Ist es möglich, durch immunstimulatorische RNA-Oligonukleotide eine Antigen-spezifische Th1-Immunantwort zu induzieren bzw. zu verstärken? Hat die Immunisierung mit RNA-Oligonukleotiden einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum eines murinen Tumors?
- 2) Können TLR7-aktivierende RNA-Oligonukleotide eine angeborene NK-Zell-Antwort triggern? Wenn ja, welche zellulären und molekularen Mechanismen spielen dabei eine Rolle?

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Oligonukleotide

##### 3.1.1 Verwendete Sequenzen

Für die Untersuchung der immunstimulatorischen Wirkung von Oligoribonukleotiden (ORN) wurde die Sequenz 9.2dr (= *double right*, zweimal die gleiche Sequenz hintereinander) verwendet (s.Tab.1). 9.2 ist eine aus neun Basen bestehende immunstimulierende RNA-Sequenz (GUCCUUCAA), die Teil einer längeren Oligonukleotid-Kette sein muss, um aktiv zu sein [Hornung et al. 2005]. Die für die vorliegende Arbeit verwendete Sequenz 9.2dr enthält zweimal das immunstimulierende Motiv, verbunden durch eine Uridin-Base. Zur Überprüfung der sequenzabhängigen Wirkung von 9.2dr wurde eine Poly A RNA-Sequenz zum Vergleich eingesetzt. Der TLR9-Ligand CpG-Oligodesoxynukleotid (ODN) 1826 diente als Positivkontrolle. Die RNA-Nukleotide hatten entweder ein Rückgrat aus physiologischen Phosphodiester-Verbindungen (PD) oder ein komplett Phosphorothioat-modifiziertes Rückgrat (PTO). PTO-Modifikation bedeutet dabei, dass die freien Sauerstoffatome der Phosphatgruppen durch Schwefelatome substituiert sind [Krieg 2002]. PTO-Modifikation schützt vor Degradation durch Nukleasen. Die CpG-ODN waren stets PTO-modifiziert. Gelöst wurden die Oligonukleotide in sterilem H<sub>2</sub>O. Die ORN wurden von der Firma CureVac (Tübingen, Deutschland) bezogen, CpG von der Firma Coley Pharmaceutical Group (Langenfeld, Deutschland).

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Referenz
9.2dr (bzw. 9.2dr PTO)	<b>UGUCCUUCAAUGUCCUUCAA</b>	[Hornung et al. 2005]
Poly A (bzw. Poly A PTO)	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	[Hornung et al. 2005]
CpG 1826	TCCATGACGTTCTGACGTT	[Yi et al. 1998; Brunner et al. 2000]

**Tab. 1. Verwendete Oligonukleotide**



### 3.1.2 Komplexierung und Verdünnung

Die Konzentration der Stammlösungen betrug 2 mg/ml für RNA und 20 mg/ml für CpG. Um die Aufnahme in Zellen zu verbessern, wurden die Oligonukleotide mit dem kationischen Lipid DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-Trimethylammonium Methylsulfat) (c = 1 mg/ml) komplexiert (Fa. Roche, Mannheim, Deutschland). Dazu wurden die ORN bzw. ODN 20 Minuten bei RT mit DOTAP gemischt im Verhältnis 1:2 für *in vitro*-Experimente bzw. im Verhältnis 1:5 für *in vivo*-Versuche. Verdünnungen erfolgten in PBS (*Phosphate-buffered saline*; Fa. PAA, Linz, Österreich) oder HBSS (*Hank's balanced saline solution* mit Chlorid und Magnesium; Fa. PAA, Linz, Österreich). Soweit nicht anders angegeben, wurden *in vitro*-Konzentrationen von 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml eingesetzt. Für Injektionen wurden 20 bis 40 µg Oligonukleotid (in 100 µl bzw. 200 µl DOTAP) in einem Gesamtvolumen von 150 - 200 µl verwendet.

## 3.2 Zellkultur

### 3.2.1 Medien und Zusätze

β-Mercaptoethanol	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
DMEM ( <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> )	Fa. PAA (Pasching, A)
FCS (Fetales Kälberserum)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
G418	Fa. Invitrogen (Karlsruhe, D)
GM-CSF ( <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> )	Fa. Tebu Bio (Offenbach, D)
HEPES-Puffer	Fa. Biochrom (Berlin, D)
IL-4 (Interleukin-4)	Fa. Tebu Bio (Offenbach, D)
L-Glutamin	Fa. PAA (Pasching, A)
Na-Pyr (Natrium-Pyruvat)	Fa. Biochrom (Berlin, D)
NEAA ( <i>Non essential amino acids</i> )	Fa. Biochrom (Berlin, D)
Penicillin	Fa. PAA (Pasching, A)
RPMI 1640 ( <i>Royal Park Memorial Institute</i> ) Medium	Fa. PAA (Pasching, A)
Streptomycin	Fa. PAA (Pasching, A)

Die verwendeten Medien für die Zellkultur waren folgendermaßen zusammengesetzt:

RPMI-Vollmedium:

100 IU/ ml Penicillin  
100 µg/ ml Streptomycin  
1,5 mM L-Glutamin  
10 Vol % FCS  
in RPMI 1640-Medium

DMEM-Vollmedium:

100 IU/ ml Penicillin  
100 µg/ ml Streptomycin  
1,5 mM L-Glutamin  
10 Vol % FCS  
in DMEM-Medium

E.G7- Medium:

100 IU/ ml Penicillin  
100 µg/ ml Streptomycin  
1,5 mM L-Glutamin  
10 Vol % FCS  
1 mM Na-Pyr  
10 mM Hepes-Puffer  
0,4 mg/ml G418  
1/1000 β-Mercaptoethanol  
in RPMI 1640-Medium

RMA und YAC-1-Medium:

100 IU/ ml Penicillin  
100 µg/ ml Streptomycin  
1,5 mM L-Glutamin  
10 Vol % FCS  
1 mM Na-Pyr  
1 mM NEAA  
in RPMI 1640-Medium

### 3.2.2 Kulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank (Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland) bei einer Temperatur von 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 %igen CO<sub>2</sub>/Luftgemisch. Alle Zellkulturarbeiten wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow (Lamin Air HB 244 8; Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland) durchgeführt.

### 3.2.3 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die Bestimmung der Zahl vitaler Zellen wurde mit Hilfe von Trypanblau (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus, tote Zellen werden blau angefärbt. Zellzahlen wurden durch Auszählen geeigneter Verdünnungen in einer Neubauer-Zählkammer (Fa. Optik Labor Frischknecht, Balgach, Deutschland) ermittelt.

### 3.2.4 Verwendete Zelllinien

Für die Tumorversuche wurden die OVA-exprimierenden Tumorzellen E.G7 (murine T-Zell-Lymphomlinie, C57BL/6-Hintergrund) [Makki et al. 2002] und als Referenz die nicht-OVA exprimierenden EL4-Zellen verwendet [Vabulas et al. 2000; Ghose et al. 1977]. Diese wurden freundlicherweise von Prof. Brocker (Institut für Immunologie der Universität München, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Kultur der Zellen erfolgte in E.G7-Medium. Zur Messung der Invasion von NK-Zellen in die Tumorumgebung wurden das NK-sensitive, TAP-defiziente (somit MHC-I-negative) RMA-S T-Zelllymphom und die Wildtyp-Variante RMA (C57BL/6-Hintergrund) verwendet [Glas et al. 2000]. Diese wurden freundlicherweise von Dr. Charo (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin, Deutschland) bereit gestellt. Die Zellen wurden in RMA-Medium kultiviert. Die NK-sensitive murine Lymphom-Zelllinie YAC-1 [Durdik et al. 1980] wurde als Target zur Messung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen verwendet. Diese wurde freundlicherweise von Dr. Mocikat (Helmholtz Zentrum München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in YAC-1 Medium kultiviert.

### 3.2.5 Kokulturen

DCs wurden mit der jeweils angegebenen Konzentration an ORN oder ODN für 6 h stimuliert, dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Splenozyten oder aufgereinigten NK-Zellen für weitere 18 h kokultiviert. Es wurden jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen der einen mit  $2 \times 10^5$  Zellen der anderen Population in 200 µl Medium in 96-Well-Platten mit Rundboden kokultiviert. Zur Inkubation von Splenozyten oder NK-Zellen mit Überständen von DCs wurden DCs zunächst für 6 h stimuliert, gewaschen und für weitere 18 h kultiviert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und je 200 µl Überstand zu  $2 \times 10^5$  Zellen gegeben. Zum Blocken von Zytokinen im Überstand wurden 2 h vor Koinkubation monoklonale Antikörper gegen IL-2 (20 µg/ml), IL-6 (5 µg/ml), IL-12p40 (40 µg/ml) und IL-15 (2 µg/ml) eingesetzt (s. Tab. 2).

Antikörper	Klon	Herkunft
Anti-mouse-IL-2	JES6-1A12	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-mouse-IL-6	MP520F3	R&D Systems, Minneapolis, USA
LEAF <sup>TM</sup> Anti-mouse-IL12/IL-23 p40	C17.8	BioLegend, San Diego, USA
Anti-mouse-IL-15	AIO.3	MBL International, Woburn, USA

**Tab. 2 Verwendete monoklonale Antikörper zum Neutralisieren von Zytokinen**

### 3.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus murinem Gewebe

#### 3.3.1 Gewinnung von Milzzellen

Für die Gewinnung von Milzzellen (Splenozyten) wurde eine anästhesierte Maus durch zervikale Dislokation getötet und die Milz herauspräpariert. Das von Fett- und Bindegewebe befreite Organ wurde in ein mit etwa 10 ml PBS gefülltes Reagenzgefäß überführt. Zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen wurde die Milz unter sterilen Bedingungen durch ein Zellsieb von 40 µm Durchmesser (BD Falcon<sup>TM</sup>, Fa. BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gedrückt und das Sieb mit 10 ml PBS nachgespült. Die aufgefangene Suspension wurde nach Zentrifugation (7 min, 350 g, 4 °C) durch 5-minütige Zugabe von 2 ml Ammoniumchloridpuffer (Fa. BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) von Erythrozyten befreit. Nach einem letzten Waschschriff mit PBS wurden die Zellen in PBS oder Medium resuspendiert und auf Eis gelagert.

#### 3.3.3 Generierung dendritischer Zellen aus Knochenmark

Für die Gewinnung von BMDCs (*bone-marrow-derived* DCs) wurden nach Tötung der Maus die Hinterläufe mit Ethanol desinfiziert und Femur und Tibia nach Freilegung in ein mit 10 ml PBS gefülltes Reagenzgefäß überführt. Die Knochen wurden unter sterilen Bedingungen an beiden Epiphysen eröffnet und das Knochenmark mit RPMI-Vollmedium ausgespült. Die gewonnene Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb mit 40 µm Porendurchmesser filtriert und das Sieb anschließend mit 10 ml Medium nachgespült. Nach Zentrifugation (7 min, 350 g, 4°C) wurden die Erythrozyten für zwei Minuten mit Ammoniumchloridpuffer lysiert. Nach dem Waschen mit Medium wurden die Zellen in Kultur genommen, wobei dem Kulturmedium (15 ml in einer mittleren Kulturflasche) für die Reifung der dendritischen Zellen 20 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 (Fa. Tebu Bio, Offenbach, Deutschland) zugesetzt wurde. Am vierten Tag wurden die DCs erneut mit 5 ml Medium und je 20 ng/ml GM-CSF und IL-4 versetzt. DCs repräsentierten durchschnittlich 70% der Kultur. Durch Aufreinigung der DCs über MACS-Säulen (s. unten) mit CD11c-MicroBeads (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) am Tag sieben wurden die DCs auf über 97% angereichert. Die auf diese Weise gewonnenen DCs bestehen überwiegend aus mDCs (CD11c+, B220-).

### 3.3.4 Isolierung und Aufreinigung von Zellpopulationen

Für diese Arbeit wurde das System des *magnetic-activated cell sorting* (MACS) nach dem Protokoll der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Zellen werden mit magnetisch markierten Antikörpern (MicroBeads) gegen Oberflächenmoleküle gekoppelt und auf eine Säule aufgetragen, die sich in einem Magnetfeld befindet. Während die unmarkierten Zellen durchfließen, bleiben die markierten Zellen auf der Säule haften und können später eluiert werden. Es kann entweder die gesuchte Zellpopulation markiert werden (positive Selektion) oder es können Antikörper gegen eine bzw. mehrere unerwünschte Zellpopulationen eingesetzt werden (Depletion bzw. negative Selektion).

Bei der Durchführung der magnetischen Zellseparation wurden ausschließlich Produkte der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Die Isolierung dendritischer Zellen aus Splenozyten bzw. die Aufreinigung der GM-CSF/IL-4-Knochenmarkskulturen erfolgte mit anti-CD11c (N418) MicroBeads. NK-Zellen wurden mit anti-CD49b (DX5, panNK) MicroBeads aus Splenozyten isoliert. Die Markierung der Zellen mit MicroBeads erfolgte nach Herstellerprotokoll für 15 min bei 4 °C in MACS-Puffer (PBS, pH 7,2, 10 % FCS, 2 mM EDTA). Nach einem Waschschrift wurde die Zellsuspension auf die im Magnetfeld befindliche Trennsäule (LS-Säule) gegeben und die durchfließenden Zellen durch dreimaliges Spülen der Säule mit MACS-Puffer entfernt. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die magnetisch markierten Zellen mittels eines Stempels eluiert. Um die Reinheit des Eluats zu erhöhen, wurde die Auftrennung auf einer kleineren Säule (MS-Säule) wiederholt. Die Depletion erfolgte mittels LD-Säule. Die Reinheit betrug jeweils über 97%.

## 3.4 Durchflussszytometrie

### 3.4.1 Allgemeines Prinzip

Um verschiedene Zellpopulationen voneinander unterscheiden und quantifizieren zu können, kann man die Durchflussszytometrie einsetzen. Bei dieser Technik fließen die Zellen in einem *fluorescence-activated cell sorter* (FACS) einzeln hintereinander durch eine dünne Messkammer, während sie von einem Laser bestrahlt werden und ihre Lichtstreuung gemessen wird. Zur genaueren Untersuchung und Differenzierung der Zellpopulationen werden die Zellen vorher mit fluoreszierenden Antikörpern gegen entsprechende Oberflächenantigene gefärbt.

Eine Zelle wird im FACS charakterisiert durch die Streuung des Laserstrahls, welche von Größe, Form und Granularität der Zelle abhängt. Erfasst wird die Ablenkung als Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (*forward* und *side scatter*) durch einen in Verlaufsrichtung des Strahls angebrachten Vorwärtsdetektor und einen rechtwinklig dazu angeordneten Seitwärtsdetektor. Während das Vorwärtsstreulicht überwiegend von der Zellgröße abhängt, wird das Seitwärtsstreulicht wesentlich durch die Granularität bestimmt. Dies erlaubt eine erste orientierende Unterscheidung von Zellpopulationen sowie von lebenden Zellen und Zelltrümmern. Genauer charakterisiert werden die Zellen anhand der Fluoreszenzemission. Diese geht bei Laserbestrahlung von dem Fluorochrom aus, das an den auf der Zelle gebundenen Antikörper gekoppelt ist. Gemessen wird sie im 90 ° Winkel zum einfallenden Licht. Es können Emissionen mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe getrennt detektiert werden und damit die Zellen auf mehrere Oberflächenmoleküle untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde für die Messungen ein FACSCalibur Gerät (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) verwendet, dessen Anregungsoptik aus einem Argon-Laser (488 nm) und einem Dioden-Laser (635 nm) besteht und die gleichzeitige Messung von vier Fluoreszenzen erlaubt. Überlappungen der Fluoreszenzen wurden mit Hilfe von Einzelfärbungen kompensiert. Isotyp-Kontrollen dienen der Detektion unspezifischer Färbung. Isotyp-Antikörper enthalten ein Fluorochrom, sind jedoch nicht an einen Zelloberflächenantikörper gebunden. Die Auswertung der Daten erfolgte am Computer mit Hilfe der Software CellQuest (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) oder FlowJo (Tree Star, Ashland, USA).

In dieser Arbeit verwendete Fluoreszenzfarbstoffe und dazugehörige Exzitations- und Emissions- Wellenlängen:

Fluoreszenz	Exzitation [nm]	Emission [nm]
Fluorescein-Isocyanat (FITC)	494	530
Phycoerithrin (PE)	565	585
Peridinin-Chlorophyll-A-Protein (PerCP)	650	675
Allophycocyanin (APC)	650	660

### 3.4.2 Analyse der Zellaktivierung

Die Aktivierung von Zellen kann ermittelt werden über die Hochregulierung oberflächlicher Marker mittels FACS-Analyse. Für diese Arbeit wurden jeweils  $10^6$  Zellen in 200  $\mu$ l PBS in einem FACS-Röhrchen für 25 Minuten im Dunkeln bei 4 °C mit den entsprechenden Antikörpern von BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) gefärbt (s. Tab. 2). Vor Messung der Fluoreszenzintensität wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Zur Festlegung der Negativpopulationen und der unspezifischen Bindungen wurden Isotyp-Färbungen angefertigt.

Bezeichnung	Spezifität	Klon
Anti-CD3	CD3	17A2
Anti-CD3e	CD3e	145-2C11
Anti-CD4	CD4 (L3T4)	GK1.5
Anti-CD8a	CD8a (Ly-2)	53-6.7
Anti-CD11b	CD11b (Mac-1)	M1/70
Anti-CD11c	CD11c	HL3
Anti-CD45R/B220	CD45/B220	RA3-6B2
Anti-CD49b	49b/PanNK	DX5
Anti-CD69	CD69	H1.2F3
Anti-CD86	B7-2	GL1
Anti-Interferon- $\gamma$	IFN- $\gamma$	XMG1.2
Anti -NK1.1	NK1.1 (NKR P1C, NKR P1B)	PK136

**Tab. 3. Verwendete FACS-Antikörper**

### 3.4.3 Messung von intrazellulärem Interferon- $\gamma$ in T- und NK-Zellen

#### 3.4.3.1 Interferon- $\gamma$ in NK-Zellen

Zur Bestimmung der IFN- $\gamma$ -Produktion durch NK-Zellen, wurde IFN- $\gamma$  intrazellulär mittels FACS-Analyse detektiert. Dazu wurden Splenozyten 4 h nach RNA-Injektion isoliert und mit Brefeldin A (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) der Konzentration 1  $\mu$ g/ml, welches die Sekretion von Proteinen durch Blockade des Golgi-Apparats hemmt, für weitere 4 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Waschpuffer (0,5 % BSA, 0,1 %  $\text{NaN}_3$  in PBS, pH 7,0) gewaschen und in jeweils 200  $\mu$ l Puffer resuspendiert. Nach der Oberflächenfärbung mit anti-NK1.1 wurden die Zellen mit 200  $\mu$ l Fixierungspuffer (2 % PFA in PBS, pH 7,0) für 20 min bei RT fixiert und anschließend mit Waschpuffer gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 200  $\mu$ l Permeabilisierungspuffer (0,5 % Saponin, 0,5 % BSA, 0,02 %  $\text{NaN}_3$  in PBS, pH 7,0) für 20 min permeabilisiert und anschließend mit anti-IFN- $\gamma$  für 25 min bei RT inkubiert. Vor der Messung im

Durchflusszytometer wurden die Zellen zweimal mit Permeabilisierungspuffer (0,5 % Saponin, 0,5 % BSA, 0,02 % NaN<sub>3</sub> in PBS, pH 7,0) gewaschen und in 200 µl Puffer resuspendiert. Die Analyse erfolgte dann wie oben beschrieben.

#### 3.4.3.2 Interferon- $\gamma$ in OVA-spezifischen T-Zellen

Zur Messung von intrazellulärem IFN- $\gamma$  OVA-spezifischer T-Zellen wurden Splenozyten immunisierter Tiere zunächst *in vitro* mit OVA<sub>257-264</sub>-Peptid (Peptidsequenz SIINFEKL) (Fa. Metabion, Martinsried, Deutschland) restimuliert. Dazu wurden in einer 24-well Platte pro Maus jeweils 5 Mio. Splenozyten in 1,5 ml Medium für eine Stunde bei 37°C mit 5 µg/ml OVA<sub>257-264</sub>-Peptid inkubiert, ein zweiter Ansatz blieb unstimuliert. Als Positivkontrolle erfolgte die unspezifische Stimulation einer zusätzlichen Probe mit 50 ng/ml PMA (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 500 ng/ml Ionomycin (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland). Für weitere vier Stunden wurde zu allen Ansätzen 1 µg/ml Brefeldin A (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) hinzugefügt. Dadurch bleibt das von den spezifisch gegen OVA gerichteten T-Zellen produzierte IFN- $\gamma$  intrazellulär und kann dort nachgewiesen werden. Nach der Restimulation wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und wie oben beschrieben weiter behandelt. Die Oberflächenfärbung erfolgte mit anti-CD8 Antikörper.

#### 3.4.4 Ermittlung Antigen-spezifischer T-Zellen mittels MHC-I-Pentamer

Zum Nachweis Antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen kann die Tatsache genutzt werden, dass diese ihr Zielpeptid erkennen und an den spezifischen T-Zell-Rezeptor (TZR) binden, wenn es in MHC-I-Komplexen präsentiert wird. Mittels synthetisierter Peptid-beladener MHC-I-Moleküle, die an ein Fluorochrom gekoppelt sind, können die spezifischen T-Zellen gebunden und im Durchflusszytometer detektiert werden. Zur Erhöhung der Sensitivität liegen die verwendeten MHC-I-Moleküle als Tetramere oder Pentamere vor, das heißt sie werden durch Streptavidin zu einem Komplex aus vier bzw. fünf Peptid-beladenen MHC-Molekülen zusammengefügt.

Um OVA-spezifische T-Zellen in Splenozyten immunisierter Mäuse zu detektieren, wurden 3 Mio. Zellen in 50 µl Waschpuffer (0,1 % BSA, 0,1 % NaN<sub>3</sub> in PBS, pH 7,0) resuspendiert und anschließend mit 10 µl H-2k<sup>b</sup>-OVA<sub>257-264</sub>-Pentamer (Fa. Proimmune, Cambridge, USA) für 15 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Nach einem Waschschriff mit Waschpuffer erfolgte die Oberflächenfärbung mit anti-CD8. Nach einem weiteren Waschschriff wurden die Splenozyten in 200 µl Puffer im Durchflusszytometer auf Pentamer positive CD8<sup>+</sup> T-Zellen analysiert.



### 3.5 Zytotoxizitäts-Assays

#### 3.5.1 Bestimmung der *in vivo*-Zytotoxizität durch zytotoxische T-Zellen

Zur Untersuchung der antigen-spezifischen zytotoxischen Funktion von CD8<sup>+</sup>T-Zellen wurde ein *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. In diesem Assay werden naive Splenozyten *in vitro* mit einem Antigen beladen, sodass sie dieses dann im MHC-I-Komplex präsentieren. In immunisierten Mäusen werden diese Antigen-präsentierenden Zellen durch spezifische zytotoxische T-Zellen erkannt und zerstört. Um diese antigen-spezifische Zytolyse nachweisen zu können, werden die Splenozyten in zwei Fraktionen aufgeteilt, wobei die eine mit Peptid beladen wird, während die andere unbeladen bleibt. Zusätzlich werden die Zellen mit dem Farbstoff CFSE (5-(6-)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester) angefärbt. Dieser bindet spontan und irreversibel sowohl intrazelluläre als auch oberflächliche Moleküle und ist durch seine Eigenfluoreszenz im Durchflusszytometer im FITC-Kanal detektierbar. Um beide Fraktionen später voneinander unterscheiden zu können, werden die beladenen Zellen mit einer 10fach höheren Konzentration CFSE (CFSE<sup>high</sup>) gefärbt. Nach der Färbung werden beide Zellpopulationen in immunisierte Tiere i.v. gespritzt. Die Antigen-beladene Zellfraktion wird in immunisierten Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren bei erfolgter Zytolyse abnehmen, während die unbeladene Fraktion gleich bleibt. Die spezifische Lyse in immunisierten Mäusen wird in Relation zu nicht immunisierten Kontrolltieren mit Hilfe folgender Formel berechnet: spezifische Lyse (%) = 100% x (1 - bereinigte Überlebensprozentzahl). Die bereinigte Überlebensprozentzahl ergibt sich hierbei aus dem Verhältnis (CFSE<sup>high</sup> / CFSE<sup>low</sup>) / Mittelwert dieses Quotienten der Kontrolltiere].

Für diese Arbeit wurde eine Fraktion naiver Splenozyten mit 100 µg/ml OVA<sub>257-264</sub>-Peptid 1 h bei 37°C in einem Volumen von 500 µl inkubiert. Diese und die unbeladene Fraktion wurden danach zweimal mit HBSS gewaschen. Der Anteil peptidbeladener Zellen wurde anschließend mit 15 µl 1 mM CFSE (Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) markiert (CFSE<sup>high</sup>), während der unbeladene mit 15 µl 0,1 mM CFSE gefärbt wurde (CFSE<sup>low</sup>). Beide Färbungen erfolgten in einem Volumen von 1 ml für 15 min bei RT. Nach einmaligem Waschen in HBSS wurden die Fraktionen im Verhältnis 1:1 gemischt und jeweils 1x10<sup>7</sup> Zellen i.v. injiziert. 16 h nach Injektion wurden die Tiere getötet und Splenozyten isoliert. Im Anschluss wurden die Zellen im FACS analysiert und die spezifische Lyse CFSE-gelabelter Zielzellen ermittelt.

### 3.5.2 Bestimmung der Zytotoxizität durch NK-Zellen

Zur Untersuchung der zytotoxischen Funktion von NK-Zellen, wurden ein *in vitro*- und ein *ex vivo*-Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. Dazu wurden aufgereinigte NK-Zellen *in vitro* für 4 h mit dem Überstand dendritischer Zellen inkubiert, welche zuvor für 6h mit 10 µg/ml RNA stimuliert, gewaschen und für weitere 18 h kultiviert wurden. Die *in vivo*-Stimulation von NK-Zellen erfolgte durch i.v. Injektion von 40 µg RNA in naive Mäuse. Nach 4 h wurden Splenozyten gewonnen und NK-Zellen daraus isoliert. Die *in vitro*- oder *in vivo*-aktivierten NK-Zellen wurden dann in einer 96-Well-Platte in absteigender Konzentration ausplattiert (von  $5 \times 10^5$  Zellen/100 µl bis  $7,8 \times 10^3$  Zellen/100 µl in RPMI-Medium ohne Phenolrot, versetzt mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin und 1 IU/ml Penicillin). Die Zielzellen YAC-1 ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden mit 10 µM AM-Calcein (Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) für 30 min bei 37°C markiert, anschließend dreimal mit PBS gewaschen und bei Resuspension auf eine Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Daraufhin wurden die NK-Zellen für 4 h bei 37°C mit  $1 \times 10^4$  Zielzellen im angegebenen Mischungsverhältnis inkubiert. Für die Messung der Zytotoxizität der *in vitro*-stimulierten NK-Zellen wurde nur das Verhältnis 25:1 NK-Zellen zu Zielzellen gewählt. Nach Kokultur wurden 150 µl Überstand auf eine neue Platte transferiert und die Fluoreszenz bei 485/535 nm gemessen [Neri et al. 2001].

## 3.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

### 3.6.1 Zytokinmessung in Seren und Zellüberständen

Zur Erfassung von Zytokinen im murinen Blutserum oder in Überständen von Zellen wurde ein *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) in Sandwich-Technik durchgeführt. Bei dieser Technik wird das Zytokin als Antigen von einem an einer Platte haftenden Antikörper (*capture antibody*) gebunden. Mit Hilfe eines zweiten biotinylierten anti-Zytokin Antikörpers (*detection antibody*), erfolgt die Detektion. Dies geschieht durch Zugabe eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats, das an Biotin bindet. Eine Substratlösung setzt das gebundene Enzym dann zu einem Farbstoff um, dessen Intensität (optische Dichte, OD) in einem ELISA-Reader gemessen wird. Anhand einer Standardkurve, die mit einem Zytokin bekannter Konzentration erstellt wird, kann die Zytokinkonzentration der Proben bestimmt werden.

Für IL-12p70, IL-12p40 und IFN-γ wurden Reagenzien von BD Biosciences (BD OptEIA™ Mouse ELISA Set) entsprechend des Herstellerprotokolls verwendet. Für IL-6 wurde ein ELISA Set der Fa. Biosource (Solingen, Deutschland) verwendet. Proben wurden in der Regel in einer 1:2 Verdünnung aufgetragen. IFN-α wurde ohne kommerzielles ELISA-Set nach folgendem Protokoll bestimmt: Der *capture antibody* (monoklonaler anti-IFN-α

Antikörper, *rat anti-mouse*, Klon RMMA-1, Fa. PBL Biomedical Laboratories, Brunswick, USA) wurde in *coating buffer* (0,2 M Natriumphosphat in H<sub>2</sub>O, pH 6,5) auf eine Konzentration von 1 µg/ml eingestellt, und eine 96-Well ELISA-Platte (Fa. Bio-Rad, München, Deutschland) wurde mit 50 µl/Well über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte für zwei Stunden bei RT mit *assay diluent* (10 % FCS in PBS) geblockt. Nach fünfmaligem Waschen mit 0,05 % Tween 20 (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) in PBS erfolgte die Inkubation der Proben und Standards (je 50 µl/Well), verdünnt in *assay diluent*, über Nacht bei 4 °C. Als Standard wurde rekombinantes murines IFN-α (Fa. PBL Biomedical Laboratories, Brunswick, USA) eingesetzt. Zur Detektion wurde nach einem weiteren Waschschrift ein polyklonaler anti IFN-α Antikörper (*rabbit anti-mouse*) (Fa. PBL Biomedical Laboratories) der Konzentration 625 ng/ml verwendet, zusammen mit einem HRP-konjugierten Antikörper (F(ab')<sub>2</sub> Fragmente, *donkey anti-rabbit*, Fa. Biomeda, Foster City, USA) der Konzentration 7,5 µg/ml. Nach dreistündiger Inkubation und einem anschließenden letzten Waschschrift wurde die Platte mit der Substratlösung (Tetramethylbenzidin und Hydrogenperoxid) (Fa. BD Biosciences) entwickelt. Nach dem Stoppen der Reaktion mit 1 M Schwefelsäure (Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland) wurde die OD bei 450 nm im ELISA-Reader (Fa. Dynatech Laboratories, Guernsey, GB) gemessen.

### 3.6.2 Bestimmung von Immunglobulinen im Serum

Serum-Antikörper gegen Ovalbumin wurden folgendermaßen gemessen: eine ELISA-Platte wurde über Nacht bei 4 °C mit 10 µg/ml OVA (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) in PBS beschichtet und anschließend für eine Stunde mit 1 % BSA (bovines Serum-Albumin, Fa. Sigma Aldrich) in PBS geblockt. Nach einstündiger Inkubation der Serumproben wurde die Platte mit 0,05 % Tween 20/ PBS gewaschen und ein HRP-konjugierter IgG, IgG1 oder IgG2a Antikörper (*goat anti-mouse*) (Fa. Southern Biotech Laboratories, Alabama, USA) der Konzentration 1 µg/ml zugegeben. Nach einem letzten Waschschrift erfolgte die Entwicklung mit o-Phenylendiamin Dihydrochlorid (Fa. Sigma Aldrich). Nach dem Stoppen mit 1 M Schwefelsäure wurde die Platte bei 405 nm gemessen. Bei fehlender Standardreihe wurde der Antikörpertiter semiquantitativ, also in Relation der Gruppen zueinander, bestimmt. Zum besseren Vergleich wurden die Seren in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt.

### 3.7 Tierversuche

#### 3.7.1 Mäusstämme und Haltungsbedingungen

Für die Experimente wurden weibliche C57BL/6 Mäuse von der Fa. Harlan Winkelmann, (Borchen, Deutschland) bezogen und frühestens nach einwöchiger Akklimatisierung im Stall der Medizinischen Klinik für die Versuche herangezogen. TLR7-defiziente Mäuse (TLR7-/-) mit C57BL/6-Hintergrund wurden freundlicherweise von S. Akira (Research Institute for Microbial Disease, Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt und im Tierstall der Medizinischen Klinik weiter gezüchtet. Zu Beginn der Versuche waren die Tiere zwischen sechs und zwölf Wochen alt. Die Tierhaltung entsprach den von der Regierung von Oberbayern vorgegebenen Anforderungen. Die Pflege und Fütterung der Tiere wurde von ausgebildeten Tierpflegern übernommen. Alle Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

#### 3.7.2 Genotypisierung von Mäusen mittels Polymerasekettenreaktion

##### 3.7.2.1 DNA-Isolierung

Um die TLR7-defizienten Mäuse der Züchtung zu identifizieren, wurde eine DNA-Typisierung durchgeführt. Zur Gewinnung von DNA wurde den Mäusen Gewebe in Form einer 0,5 cm langen Schwanzbiopsie entnommen. Diese wurde über Nacht mit 2,5 µl Proteinase K (Fa. Boehringer Ingelheim, Mannheim, Deutschland) der Konzentration 14 mg/ml in 500 µl *Laird Buffer* auf dem Thermoschüttler (Modell Vibrax, Fa. Merck/Serono Diagnostics, Genf, Schweiz) bei 56 °C und 500 rpm verdaut. Am nächsten Tag wurde die lysierte Probe zentrifugiert (5 min, 14 000 rpm, RT) und der Überstand in ein neues Reagenzgefäß überführt. Zur Ausfällung der DNA wurde der Überstand mit 500 µl 70Vol%-Isopropanol (Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland) versetzt. Die DNA-Fäden wurden anschließend vorsichtig mit einer Pipettenspitze in ein neues Reagenzgefäß überführt und in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris Chlorid, 1 mM EDTA, in Wasser, pH 8,0) für 2 h auf dem Thermoschüttler (37 °C, 500 rpm) gelöst.

##### 3.7.2.2 Messung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde mit einem Spektrometer (Ultrospec 3000, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Wien, Österreich) bestimmt. Dazu wurden 2 µl DNA-Probe in 98 µl TE-Puffer in eine Küvette gegeben und die optische Dichte beim Absorptionsmaximum von 260 nm gemessen. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht dann etwa 50 µg/ml DNA.

### 3.7.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um innerhalb der DNA das TLR7-Gen zu identifizieren, wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Diese ermöglicht es, kurze DNA-Abschnitte, die für ein bestimmtes Protein codieren, in einem Nukleinsäuregemisch zu amplifizieren. Um den Zielabschnitt festzulegen, werden Oligonukleotid-Primer verwendet, die zu den Enden des Abschnitts homolog sind. Die Amplifizierung erfolgt dann mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase. Die Reaktion besteht aus drei Schritten: 1) Denaturierung (Auftrennung) des DNA-Doppelstranges, 2) Hybridisierung des Zielabschnittes mit den spezifischen Primern, 3) von den Primern ausgehende DNA-Synthese (Elongation). Das neu synthetisierte DNA-Fragment kann anschließend als Vorlage für die Synthese eines weiteren Fragments dienen, was somit in mehreren Zyklen zur exponentiellen Anreicherung des DNA-Abschnittes führt. Dieser kann dann mittels Gelelektrophorese detektiert werden (s.u.).

Zur Amplifizierung des DNA-Abschnittes, der für TLR7 codiert, wurden 2 µl isolierter DNA mit je 0,25 µl Primer TLR7 21400F (5' CAT GCC CAT CCC AGT CTC ATT CCT TCT 3') und TLR7 22080R (5' CAA AAT TTG TCT CTT CCG TGT CCA CAT CG 3') sowie NEO 1500 (5' ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG 3') versetzt (Fa. Metabion, Martinsried, Deutschland). Die PCR erfolgte pro DNA-Probe zusätzlich mit 40 U/ml Taq-Polymerase (0,125 µl), 1 µl PCR-*Enhancer* (Fa. Molzym, Bremen, Deutschland) und 200 µM dNTPs (0,5 µl) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in 1x PCR Puffer (Fa. Molzym, Bremen, Deutschland). Der Ansatz durchlief in einem Thermocycler (Modell T3, Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland) folgendes Zyklusprotokoll:

<b>Zyklus</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
1) Denaturierung	94°C	30s
2) Hybridisierung*	60°C	45s
3) Hybridisierung*	60°C	90s
4) Elongation*	74°C	60s
5) Elongation	74°C	600s
6) Abkühlung	4°C	∞

\*Je 32 Zyklen von Schritt 2 bis 4

### 3.7.2.4 Gelelektrophorese

Zur Detektion des TLR7-Gens erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese. Dazu wurde ein 1,5 %iges Agarosegel hergestellt, dies entspricht 3,0 g Agarose (Fa. Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland) in 200 ml TBE-Puffer. Nach Zugabe von 7,5 µl Ethidiumbromid, wurde das Gel in die vorgegebene Gelwanne

gegossen und 1 h lang bei RT abgekühlt. Durch Einbringen in die Elektrophorese-Kammer wurde das Gel mit TBE-Puffer überschichtet. Nach Entfernen des Kammes konnten die DNA-Proben mit fünffachem Ladepuffer in die Geltaschen geladen werden. Der Ladepuffer enthielt einen Farbstoff, der das Einpipettieren erleichterte sowie Glycerin, welches aufgrund seiner höheren Dichte das rasche Absinken in die Taschen zur Folge hatte. Nun wurde ein elektrisches Feld angelegt, welches durch Einstellen der Stromstärke auf 90 - 100 mA und Wahl eines nicht begrenzenden Spannungswertes festgelegt wurde. Da der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in die Nukleotidstränge interkaliert, konnte die Auftrennung der DNA-Fragmente im UV-Licht (366 nm) kontrolliert werden. Zur Dokumentation wurden im Anschluss an die Elektrophorese die Gele im UV-Licht mit einer Polaroidsofortbildkamera fotografiert.

### 3.7.3 Immunstimulation *in vivo* und Immunisierungen

Für die Untersuchung der antigen-unabhängigen Immunstimulation *in vivo* wurden 20 µg RNA bzw. CpG, komplexiert mit 100 µg DOTAP, intravenös injiziert. Zur Messung der intrazellulären IFN- $\gamma$ -Produktion wurden 40 µg RNA, komplexiert mit 160 µg DOTAP, gespritzt. Intravenöse Injektionen erfolgten in den Retroorbitalvenenplexus unter Isoflurananästhesie mit Forene® (Fa. Abbott, Wiesbaden, Deutschland). Für Immunisierungen wurden 20 bis 50 µg Ovalbumin aus Hühnerei (OVA) (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) zusammen mit den Oligonukleotiden s.c. in die Flanke injiziert, entweder zweimalig an Tag 0 und Tag 14 oder dreimalig an Tag 0, Tag 14 und Tag 21. Um in einem Versuch gleiche Bedingungen für Mäuse verschiedener Gruppen zu schaffen, wurde immer abwechselnd eine Maus aus jeder Gruppe gespritzt.

### 3.7.4 Blutentnahme

Blut wurde retroorbital mit Hilfe heparinisierter Kapillaren (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgenommen und in ein 1,5 ml Reagenzgefäß (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Zur Gewinnung von Plasma wurde das Blut für 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert (Microcentrifuge 5424, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und der Überstand abgenommen. Das Plasma wurde entweder unmittelbar untersucht oder zunächst bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.7.5 Adoptiver Zelltransfer

Um zu überprüfen, ob die stimulierende Wirkung von 9.2dr PTO auf natürliche Killerzellen *in vivo* indirekt über dendritische Zellen erfolgt, wurde ein adoptiver Zelltransfer etabliert. Bei diesem Versuch wurden dendritische Zellen aus Wildtyp-Mäusen in TLR7-defiziente Mäuse transferiert, welchen anschließend RNA injiziert wurde. Als Zielgröße diente die Aktivierung der TLR7<sup>-/-</sup> NK-Zellen, welche mittels FACS-Analyse bestimmt wurde.

In eine TLR7<sup>-/-</sup> Maus wurden insgesamt  $4 \times 10^7$  BMDCs aus C57BL/6 Mäusen intravenös gespritzt. Die verwendeten DCs waren entweder naiv oder *in vitro* für 4 h mit 1 µg/ml 9.2dr PTO vorstimuliert worden. Die Injektion erfolgte in zwei Schritten - pro Injektion  $2 \times 10^7$  DCs in 200 µl HBSS - im Abstand von zwei Stunden. Nach weiteren zwei Stunden wurden 20 µg 9.2dr PTO, komplexiert mit DOTAP, intravenös injiziert. Wiederum nach weiteren zwei Stunden erfolgte eine Blutabnahme zur Gewinnung von Serum. 18 h nach RNA-Injektion wurden die Mäuse getötet und die isolierten Splenozyten mittels FACS-Analyse auf Aktivierung überprüft. Als Kontrollen dienten unbehandelte Mäuse sowie Wildtyp- und Knockout-Mäuse, denen 20 µg RNA ohne DCs oder DCs ohne RNA verabreicht wurden.

### 3.7.6 Tumorversuche

#### 3.7.6.1 Prophylaktische Immunisierungen

Mäuse wurden prophylaktisch vor Tumorinduktion mit dem Antigen Ovalbumin oder mit bestrahlten OVA-exprimierenden Tumorzellen (E.G7) immunisiert. Die Immunisierungen erfolgten an Tag 0, Tag 7 und Tag 21 mit 50 µg OVA plus 10 µg RNA bzw. CpG oder nur mit 50 µg OVA s.c.. Bei der Immunisierung mit OVA wurde noch eine zusätzliche Immunisierung an Tag 14 nach Tumorinduktion durchgeführt. Für die Immunisierung mit bestrahlten Tumorzellen wurden zunächst E.G7-Zellen zur Verhinderung der Zellteilungen mit 100 Gray in einer Röntgenbestrahlungsanlage (Institut für Immunologie, LMU, München, Deutschland) bestrahlt. Anschließend wurden 5 Mio. bestrahlte E.G7-Zellen mit oder ohne RNA (20 µg) injiziert. Die Injektionen erfolgten jeweils s.c. in die Flanke, in der auch der Tumor später gesetzt wurde. Als Kontrolle dienten unbehandelte Mäuse.

#### 3.7.6.2 Tumorinduktion und Zielgrößen

Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden Versuchstieren unter Betäubung mit Isofluran  $5 \times 10^6$  vitale E.G7-Zellen in 100 µl HBSS s.c. in die Flanke injiziert. Ein palpabler Tumor entwickelte sich ab dem 5. - 7. Tag. Zur Bestimmung der Tumorgöße wurde als Maß für die Querschnittsfläche des Tumors das Produkt aus größtem Querdurchmesser

(mm) und darauf senkrechtem Durchmesser (mm) alle drei Tage bestimmt. Die Tiere wurden getötet (Isoflurannarkose und zervikale Dislokation) sobald die Tumorfläche 225 mm<sup>2</sup> überschritt. Bei der Vorstudie zeigte sich, dass die Mäuse ohne Tumorstoffvakzine durch den schnell wachsenden Tumor im Mittel 20 Tage nach Injektion der Tumorzellen getötet werden müssen.

#### 3.7.6.3. Detektion tumorinfiltrierender NK-Zellen

Um zu untersuchen, ob NK-Zellen nach RNA-Injektion vermehrt in die Tumorumgebung einwandern, wurden Mäuse mit 20 µg Oligonukleotid, komplexiert mit DOTAP, i.v. gespritzt. 22 h später wurden 4 x 10<sup>6</sup> RMA-S Zellen injiziert. Um die Zellen der Tumorumgebung zu analysieren, wurde nach weiteren 12 h eine Peritoneallavage durchgeführt. Dazu wurde nach Töten der Mäuse das Peritoneum freipräpariert und 5 ml PBS in die Bauchhöhle injiziert. Die Bauchhöhle wurde dann, ohne diese zu verletzen, je dreimal gespült. Anschließend wurde das Peritoneum mit Hilfe eines Skalpell vorsichtig mit einer kleinen Öffnung versehen und die zellhaltige Flüssigkeit in Reagenzröhrchen aufgefangen. Durch FACS-Analyse wurde der prozentuale Gehalt an NK-Zellen ermittelt.

### 3.9 Statistische Analyse

Um die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse zu berechnen, wurde entweder der zweiseitige *Student-t*-Test für Stichproben parametrischer Verteilungen oder der ungepaarte ANOVA-Test (*one-way analysis of variance*) angewendet. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede im Tumorwachstum wurde der Mann-Whitney Test, für das Überleben der *log-rank*-Test verwendet. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten < 0,05; p < 0,02 bzw. p < 0,002 angenommen und ist durch Markierung mit \*; \*\* bzw. \*\*\* angezeigt. Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS (Fa. SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe der Programme von Microsoft Office (Fa. Microsoft Cooperation, Redmond, USA), Adobe Photoshop und Adobe Illustrator (Fa. Adobe Systems Inc., San Jose, USA).

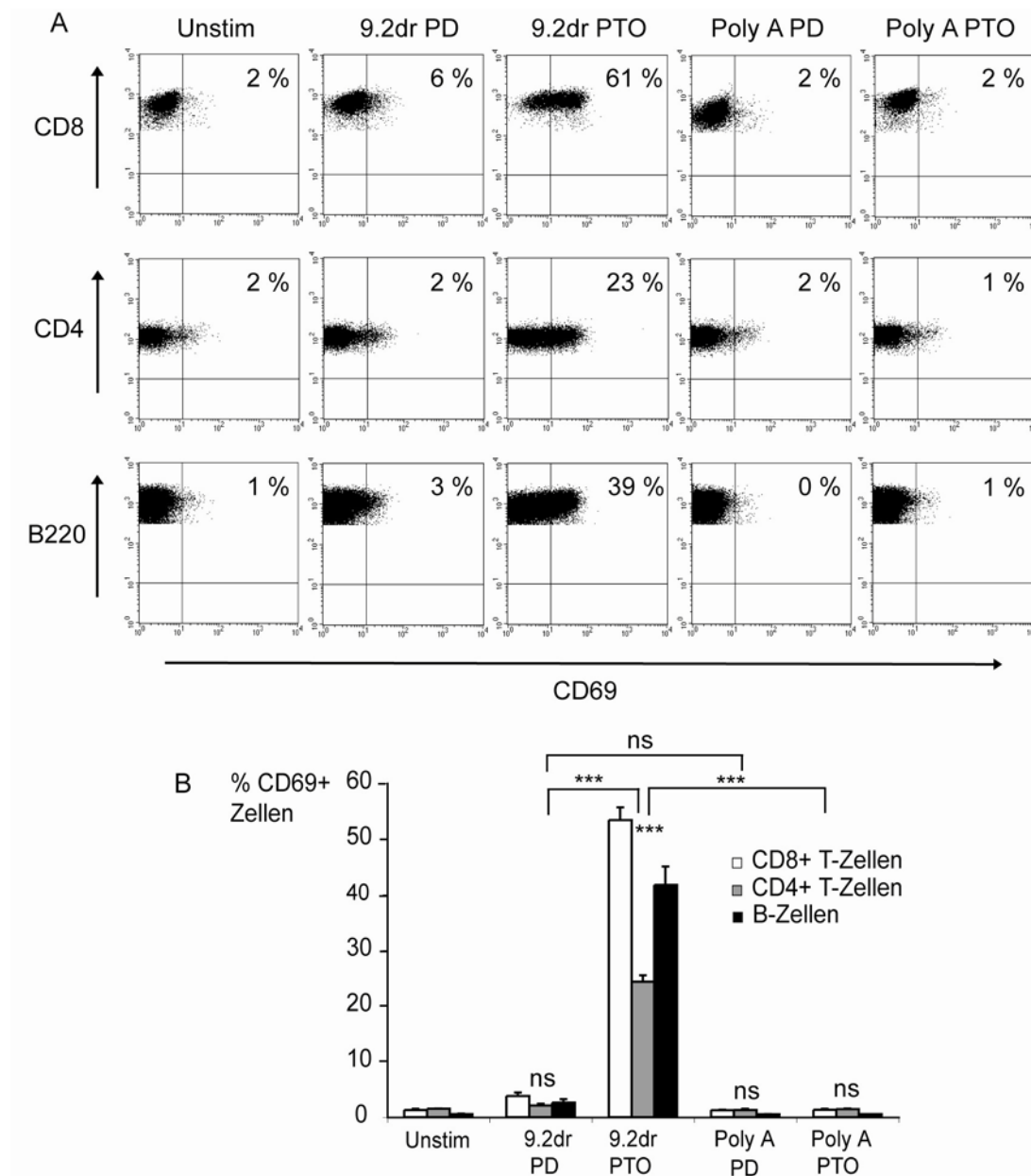


## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Induktion einer T-Zell-Antwort

#### 4.1.1 Aktivierung von Lymphozyten *in vivo*

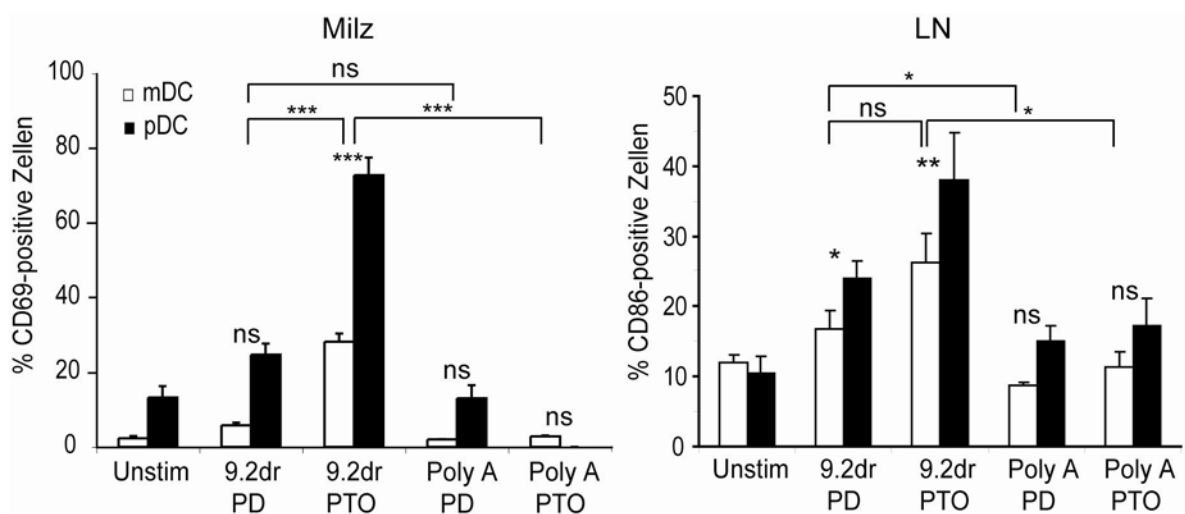
Um die immunstimulatorische Wirkung von Oligoribonukleotiden (ORN) *in vivo* zu charakterisieren, wurde Mäusen intravenös RNA der Sequenz 9.2dr oder Poly A verabreicht. Die RNA-Oligonukleotide wurden dabei entweder mit physiologischem Phosphodiester-Rückgrat (PD) oder mit Phosphorothioat-modifiziertem Rückgrat (PTO) eingesetzt. PTO-Modifikation wurde verwendet, um die RNA-Oligonukleotide vor Degradation durch Nukleasen zu schützen. Der immunstimulatorische Effekt wurde anhand der Expression von CD69 auf CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T- Zellen und auf B-Zellen bestimmt. CD69 ist ein sehr sensibler Aktivierungsmarker, der rasch auf unspezifische Stimulation von Lymphozyten hochreguliert wird [Testi et al. 1989]. Eine deutliche Hochregulierung von CD69 zeigte sich sowohl für T- als auch B- Zellen vor allem nach Injektion von 9.2dr PTO (s. Abb 1 A und B). Die Werte waren vergleichbar mit denen nach Injektion von CpG (Mittelwerte CD69-positiver Zellen nach CpG-Injektion: CD8<sup>+</sup> T-Zellen: 75 %, CD4<sup>+</sup> T-Zellen: 45 %, B-Zellen: 61 %). Das unmodifizierte 9.2dr-ORN führte nur in einem geringen Anteil der Splenozyten zur Hochregulierung der CD69-Expression, welche jedoch unter Signifikanzniveau blieb. Die Sequenz Poly A führte weder als Phosphodiester noch PTO-modifiziert zu einer signifikanten Aktivierung. RNA-Oligonukleotide aktivieren dem zu Folge Lymphozyten *in vivo*, wobei die PTO-Modifikation die Wirkung erhöht. Ungeachtet der Rückgratstruktur ist der immunstimulatorische Effekt sequenzabhängig.



**Abb. 1. PTO-modifizierte RNA-Oligonukleotide aktivieren sequenzabhängig Lymphozyten *in vivo*.** Mäuse wurden je mit 20 µg ORN i.v. behandelt. ORN wurden entweder Phosphorothioat-modifiziert (PTO) oder als Phosphodiester (PD) gespritzt. 18 h nach Injektion wurden die Splenozyten isoliert und auf Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 mittels FACS-Analyse untersucht. (A) Die Daten zeigen die Prozentzahl von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie von B-Zellen (B220<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup>), die CD69 positiv sind. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus fünf unabhängigen Versuchen. (B) Dargestellt sind die % CD69-positiven Lymphozyten als Mittelwerte der einzelnen Mäuse in einem Versuch (n=4 und n=3 für Poly A) +/- SEM. Die Daten sind repräsentativ für fünf unabhängige Versuche. (\*\*\*) ohne Klammer = Vergleich zur unstimulierten Gruppe).

#### 4.1.2 Aktivierung lienaler und nodaler dendritischer Zellen *in vivo*

Neben der Aktivierung von Lymphozyten zeigten auch myeloide und plasmazytoide dendritische Zellen der Milz eine deutliche Hochregulierung von CD69 nach Injektion von 9.2dr PTO (s. Abb. 2 A). Die Werte waren vergleichbar mit denen nach Injektion von CpG (Mittelwerte CD69 positiver Zellen nach CpG-Injektion: mDC 20 %, pDC 53 %). Das unmodifizierte 9.2dr ORN führte auch hier nur zu einer geringen Hochregulation von CD69. Eine signifikante Aktivierung der DCs blieb auch nach Injektion von Poly A sowohl als Phosphodiester wie auch PTO-modifiziert aus. Für die Expression von CD86 nodaler DCs ließen sich ähnliche Ergebnisse beobachten (s. Abb. 2 B).

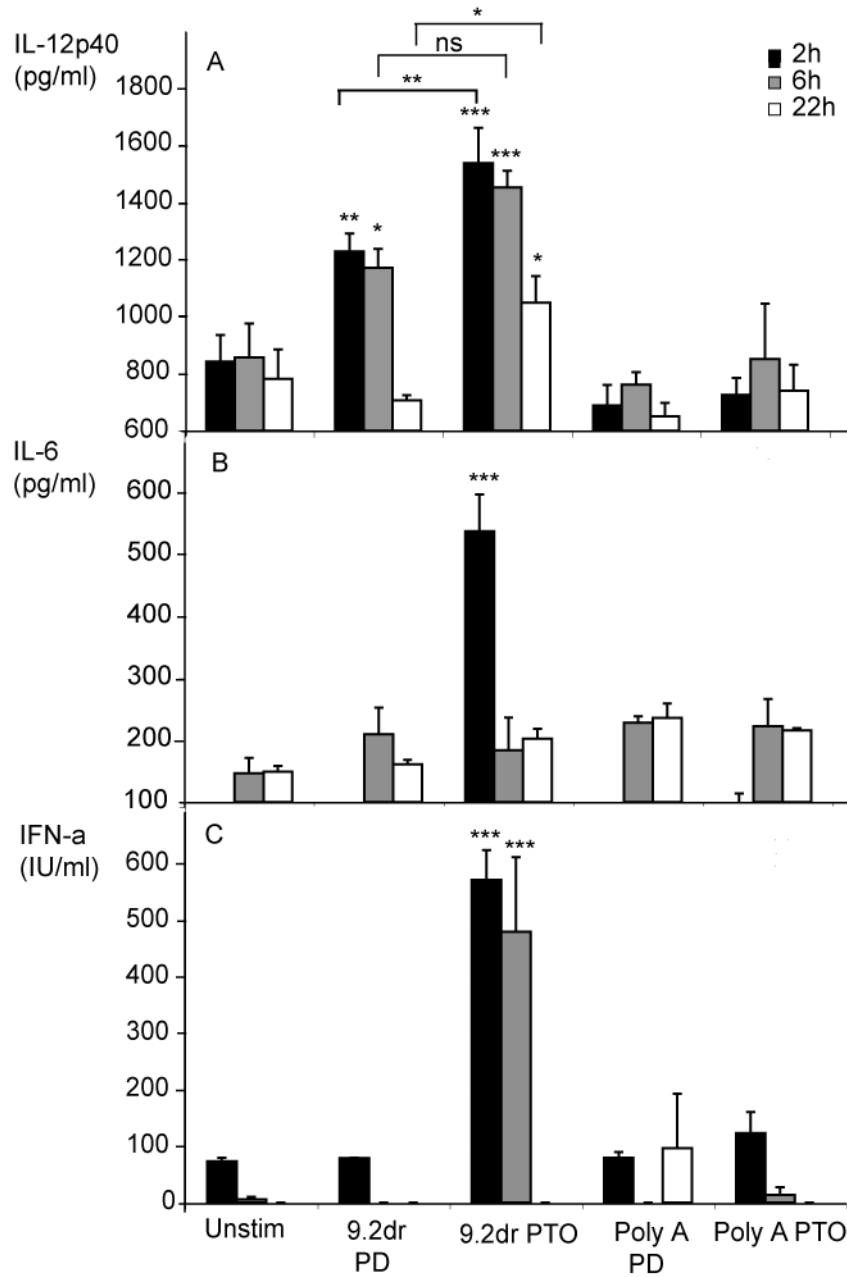


**Abb. 2. Immunstimulatorische RNA-Oligonukleotide führen zur Aktivierung lienaler und nodaler DCs.** Mäuse wurden wie in Abb. 1 mit 20 µg ORN entweder als PD oder PTO-modifiziert behandelt. 18 h später wurden Milzen (A) und periphere Lymphknoten (LN) (B) exstirpiert. mDCs (CD11c<sup>+</sup>, B220<sup>-</sup>) und pDCs (CD11c<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>) wurden auf Expression der Aktivierungsmarker CD69 bzw. CD86 analysiert. Die Daten zeigen Mittelwerte der Gruppen eines Versuchs +/- SEM (n=4 bzw. n=3 für Poly A). Die Daten zeigen die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs aus fünf unabhängigen Versuchen. (\* ohne Klammer = Vergleich zur unstimulierten Gruppe).

#### 4.1.3 Erhöhung der Serumkonzentration proinflammatorischer Th1-Zytokine

Ein wichtiges Maß für die immunstimulatorische Wirkung einer Substanz ist deren Einfluss auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine. Um diesen Einfluss von RNA *in vivo* zu untersuchen, wurde Mäusen 2, 6 und 22 Stunden nach intravenöser Injektion von RNA Blut abgenommen und die Serumkonzentrationen der Th1-Zytokine IL-12, IL-6 und IFN-α bestimmt (s. Abb. 3). Die Konzentration der Untereinheit von IL-12, IL-12p40, stieg bereits 2 Stunden nach Injektion von 9.2dr und 9.2dr PTO an und blieb auch nach 6 Stunden

noch signifikant über dem Ausgangswert. Nach 22 Stunden war nur im Serum von Mäusen, die mit 9.2dr PTO gespritzt wurden - nicht jedoch mit 9.2dr -, der Wert noch über Ausgangsniveau.



**Abb. 3. Immunstimulatorische ORN induzieren *in vivo* die Produktion von Th1-Zytokinen.** Mäuse wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach i.v. Injektion von 20 µg RNA geblutet. Die Serumkonzentrationen von IL-12p40 (A), IL-6 (B) und IFN-α (C) wurden anschließend mittels ELISA bestimmt. Die Abb. zeigt die Mittelwerte der einzelnen Mäuse einer Gruppe (n = 4 bzw. n = 3 für Poly A) +/- SEM. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuche. (\* ohne Klammer = Vergleich zur unstimulierten Gruppe).

Die maximale Konzentration für IL-6 wurde 2 Stunden nach Injektion von 9.2dr PTO erreicht und sank bereits nach 6 Stunden wieder auf den Grundspiegel ab. 9.2dr PTO erhöhte IFN- $\alpha$  signifikant nach 2 und 6 Stunden im Serum, nach 22 Stunden war das Zytokin nicht mehr nachweisbar. Das unmodifizierte 9.2dr zeigte keine Auswirkung auf die Serumkonzentrationen von IL-6 und IFN- $\alpha$ . Keines der Zytokine wurde durch Poly A oder Poly A PTO im Serum erhöht. Als Positivkontrolle wurden Zytokine im Serum von Mäusen gemessen, welchen CpG gespritzt wurde (2-Stunden-Werte: IL-12p40: 2450 pg/ml; IL-6: 1390 pg/ml; IFN- $\alpha$ : 1015 IU/ml). Die Daten zeigen, dass die systemische Applikation von RNA-ORN zu einer systemischen Immunantwort mit Bildung von Th1-Zytokinen führt, wobei auch diese Wirkung abhängig von der Sequenz und dem Rückgrat der RNA-Oligonukleotide ist.

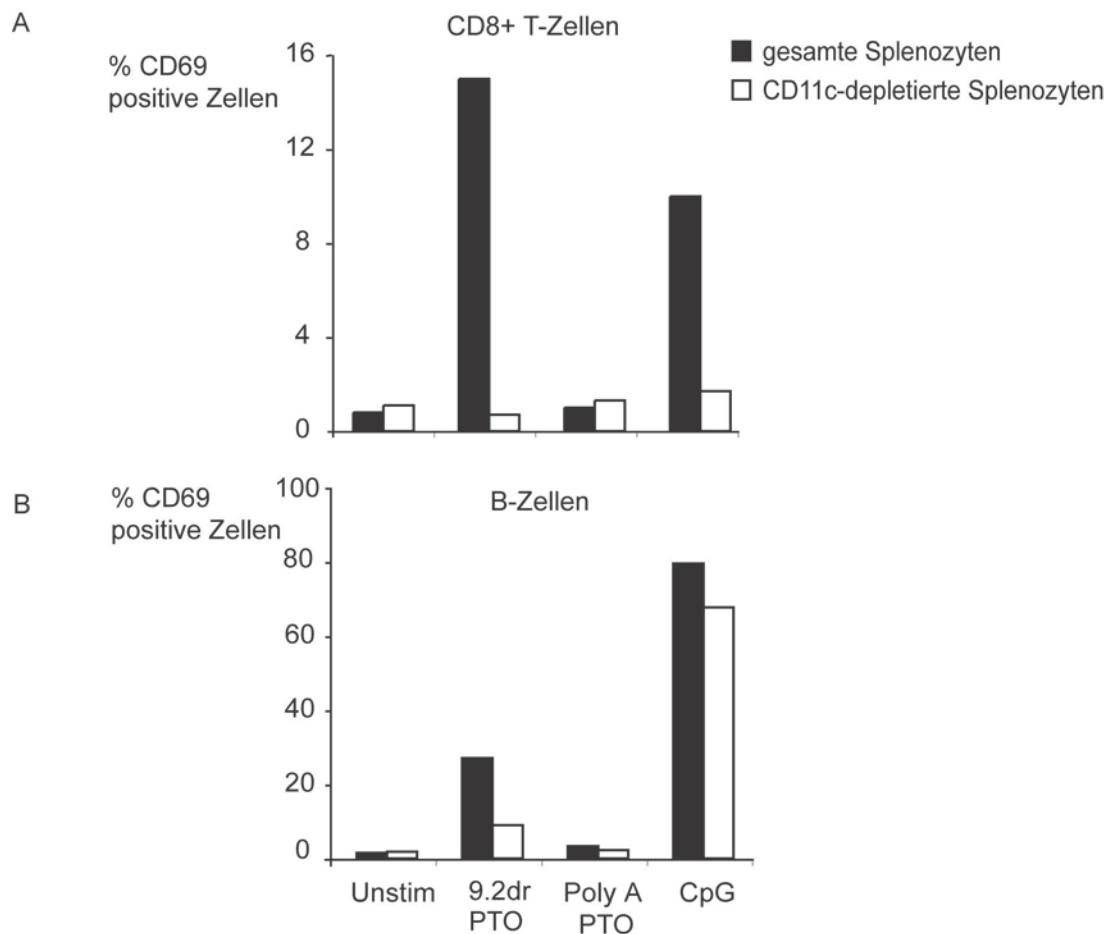
#### 4.1.4 Abhängigkeit der Lymphozytenaktivierung von dendritischen Zellen

In den oben beschriebenen Versuchen zeigte sich interessanter Weise eine Antigen-unabhängige Immunstimulation von T- und B-Zellen. Da T-Zellen kaum TLR7 exprimieren, stellte sich die Frage, ob ein indirekter molekularer oder zellulärer Mechanismus dieser Antigen-unabhängigen „*Bystander*-Aktivierung“ zu Grunde liegt. In der Literatur ist für andere TLR-Liganden beschrieben, dass DCs dabei eine Rolle spielen [Kamath et al. 2005]. Deshalb wurde hier untersucht, ob die „*Bystander*-Aktivierung“ von T- und B-Zellen durch RNA-Oligonukleotide von DCs vermittelt wird.

##### 4.1.4.1 Anwesenheit dendritischer Zellen als Voraussetzung für die Lymphozyten-aktivierung

Um die Rolle von DCs bei der Antigen-unabhängigen Aktivierung von T- und B-Zellen durch RNA-Oligonukleotide zu untersuchen, wurden CD11c<sup>+</sup> DCs aus Splenozyten mittels MACS-Depletion entfernt. Die so gewonnenen CD11c-depletierten Splenozyten wurden *in vitro* mit 9.2dr PTO oder Poly A PTO bzw. CpG stimuliert. Nach 6 h wurde die Aktivierung von B-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen anhand der CD69-Expression ermittelt und mit der Aktivierung von T- und B-Zellen DC-haltiger Splenozyten verglichen. Es zeigte sich dabei, insbesondere für die Aktivierung von T-Zellen, eine deutliche Abhängigkeit von DCs (s. Abb. 4 A). T-Zellen wurden sowohl nach Stimulation mit 9.2dr PTO als auch mit CpG nur innerhalb der gesamten Splenozyten aktiviert, nicht aber in CD11c-depletierten Splenozyten. Poly A PTO führte weder im gesamten Splenozytenkontext noch in CD11c-depletierten Splenozyten zu einer Aktivierung von T-Zellen. Die Expression von CD69 auf B-Zellen hingegen zeigte nach Stimulation mit 9.2dr PTO eine geringere DC-Abhängigkeit (s. Abb. 4 B), da auch eine geringe Aktivierung in CD11c-depletierten Splenozyten zu

beobachten war. Der Anteil CD69-positiver B-Zellen in CD11c-depletierten Splenozyten nach CpG-Stimulation jedoch war vergleichbar mit dem der gesamten Splenozyten. Poly A PTO aktivierte B-Zellen in keiner der beiden Splenozytengruppen. Damit zeigt sich, dass die immunstimulatorische Wirkung von RNA auf B- und vor allem T-Zellen die Anwesenheit von DCs voraussetzt.

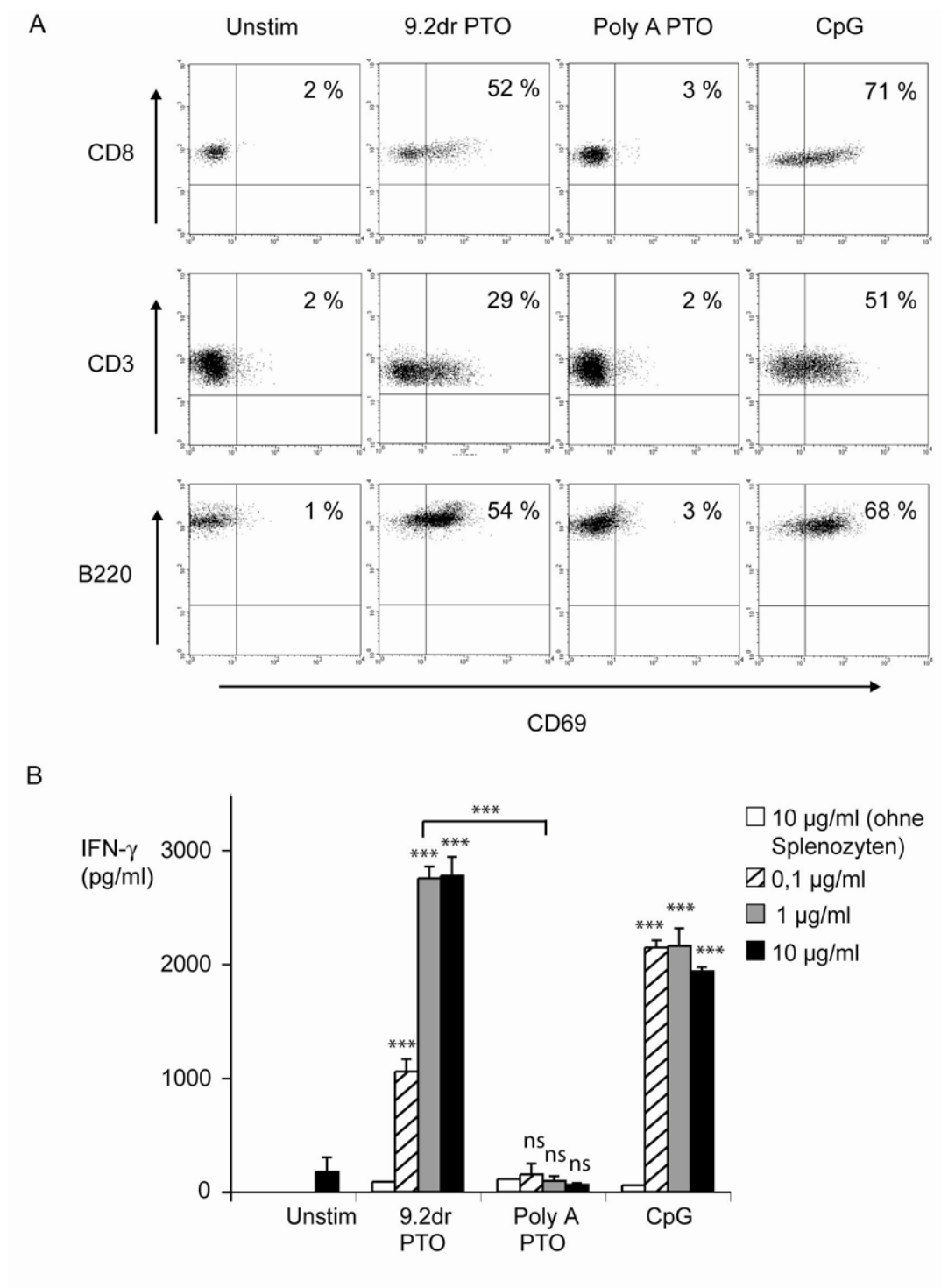


**Abb. 4. Die Aktivierung von T- und B-Zellen durch RNA ist abhängig von DCs.**

Komplette Splenozyten und CD11c-depletierte Splenozyten wurden *in vitro* stimuliert mit 1 µg/ml RNA bzw. CpG. Nach sechsständiger Stimulation wurde die Aktivierung durch Ermittlung der % CD69-positiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen (A) und B-Zellen (B) bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus Duplikaten. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

#### 4.1.4.2 Induktion der Produktion von Interferon- $\gamma$ durch RNA-stimulierte dendritische Zellen

Da sich zeigte, dass die immunstimulatorische Wirkung von RNA auf Lymphozyten DC-abhängig ist, wurde nun getestet, ob Splenozyten alleine durch RNA-stimulierte DCs aktiviert werden können. Dazu wurden BMDCs *in vitro* mit 9.2dr PTO, Poly A PTO oder CpG (0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ ) stimuliert und anschließend mit naiven Splenozyten kokultiviert. Um sicher zu stellen, dass die Lymphozyten nicht durch RNA direkt stimuliert werden, wurden die DCs vor Kokultur gewaschen. Nach Kokultur wurde die Aktivierung von CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie B-Zellen anhand der Hochregulierung der CD69-Expression und der Produktion des Effektorzytokins IFN- $\gamma$  ermittelt. Es zeigte sich, dass die Lymphozyten durch 9.2dr PTO-stimulierte DCs signifikant aktiviert (s. Abb. 5 A) und zur Produktion des Zytokins IFN- $\gamma$  angeregt wurden (s. Abb. 5 B). Die DCs selbst produzierten kein IFN- $\gamma$ . Die Werte für die Aktivierung waren vergleichbar mit denen für CpG. Die Konzentration an IFN- $\gamma$  im Überstand war für die beiden höheren Konzentrationen an 9.2dr PTO ebenfalls mit der für CpG vergleichbar. Für die niedrigste eingesetzte RNA-Konzentration war die Menge an IFN- $\gamma$  geringer, jedoch auch über Signifikanzniveau. Poly A PTO-stimulierte DCs führten weder zu einer Hochregulierung von CD69 noch zur Induktion einer Produktion von IFN- $\gamma$ . Vergleichbare Ergebnisse wurden unter Verwendung dendritischer Zellen aus der Milz, welche im Gegensatz zu BMDCs neben mDCs auch pDCs enthalten, erzielt (Daten nicht gezeigt). Dendritische Zellen konnten hier als wesentlicher Faktor der RNA-vermittelten Wirkung auf T- und B-Zellen identifiziert werden.

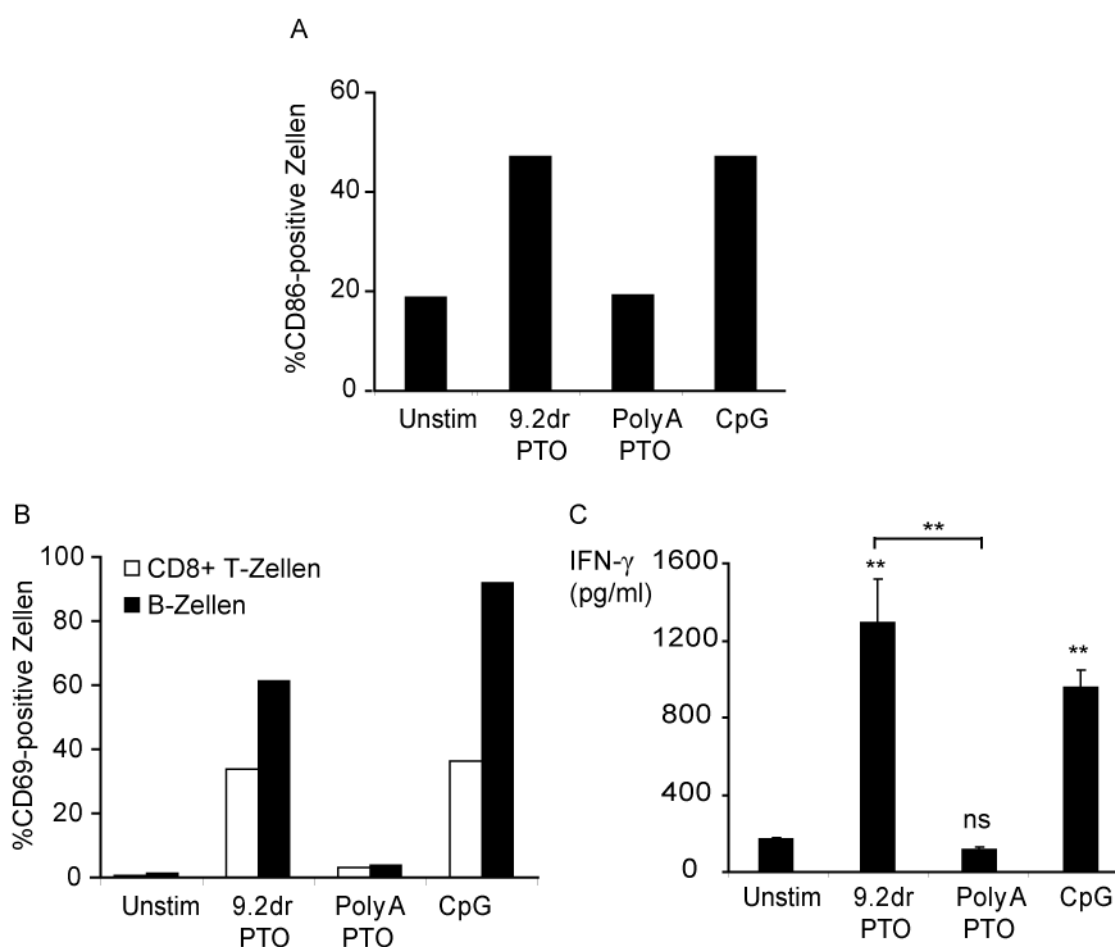


**Abb. 5. RNA-stimulierte BMDCs aktivieren naive Lymphozyten zur Produktion von Interferon- $\gamma$ .** BMDCs wurden nach sechsstündiger Stimulation mit ORN bzw. ODN (A: 1  $\mu\text{g/ml}$ ; B: s. angegebene Konzentrationen) gewaschen und mit der gleichen Anzahl naiver Splenozyten kokultiviert. (A) Nach 18 h Kokultur wurde die Hochregulation von CD69 auf den Zellen bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. (B) Zusätzlich wurde nach Kokultur die Konzentration von IFN- $\gamma$  im Überstand gemessen. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus Triplikaten  $\pm$  SEM repräsentativ für drei unabhängige Versuche. (\*\*\*) ohne Klammer = Vergleich zur unstimulierten Gruppe).



#### 4.1.4.3 Aktivierung von Lymphozyten durch sezernierte Faktoren RNA-stimulierter dendritischer Zellen

In einem nächsten Schritt wurde überprüft, ob lösliche Faktoren an der Aktivierung von Lymphozyten beteiligt sind. Dazu wurden Splenozyten mit dem Überstand RNA-stimulierter BMDCs inkubiert. Die DCs wurden zunächst *in vitro* mit RNA stimuliert. Nach 6 h Stimulation waren diese bereits aktiviert, was sich an der Hochregulierung der Expression von CD86 zeigte (s. Abb. 6 A). Der Anteil aktivierter BMDCs nach Stimulation mit 9.2dr PTO war vergleichbar mit dem nach Stimulation mit CpG. Wie erwartet führte Poly A PTO dagegen zu keiner Aktivierung.

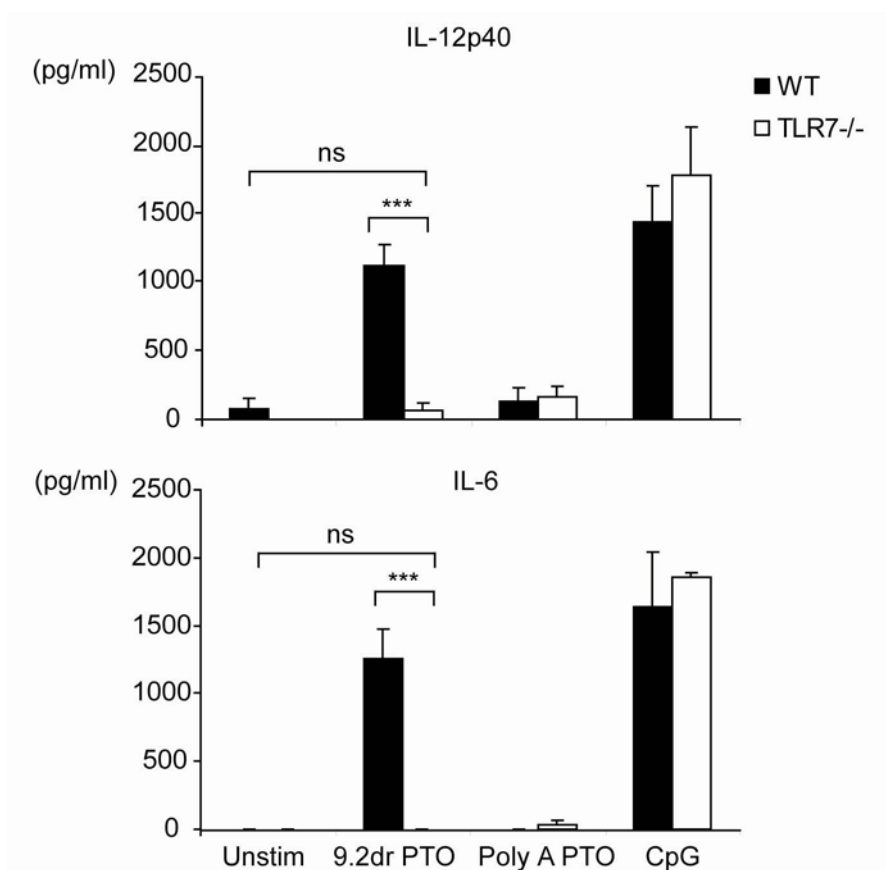


**Abb. 6. Der Überstand RNA-aktivierter BMDCs aktiviert Lymphozyten zur IFN- $\gamma$ -Produktion.** BMDCs wurden für 6 h mit 10  $\mu$ g/ml ORN bzw. CpG stimuliert. (A) Anschließend wurde deren Aktivierung gemessen. Die Abb. zeigt die Mittelwerte aus Duplikaten und ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche. (B und C) Um die Oligonukleotide zu entfernen wurden die Zellen gewaschen und für weitere 18 h kultiviert. Naive Splenozyten wurden für weitere 18 h mit diesem Überstand inkubiert. (B) CD69-Expression nach 18 h Inkubation. Die Abb. zeigt die Mittelwerte aus Duplikaten und ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche. (C) Die IFN- $\gamma$ -Produktion wurde mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikaten  $\pm$  SEM. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuche. (\*\* ohne Klammer = Vergleich zur unstimulierten Gruppe).

Die BMDCs wurden nach RNA-Stimulation gewaschen und weitere 18 Stunden kultiviert. Anschließend wurden naive Splenozyten für 18 h mit dem Überstand inkubiert. Der Überstand 9.2dr PTO-stimulierter BMDCs induzierte sowohl eine Aktivierung der B-Zellen und CD8<sup>+</sup> T- Zellen (s. Abb. 6 B) sowie die Produktion von IFN- $\gamma$  (s. Abb. 6 B). Poly A PTO zeigte auch hier keine Wirkung. Somit ließ sich feststellen, dass mDCs Faktoren sezernieren, die Splenozyten zur Bildung von IFN- $\gamma$  aktivieren.

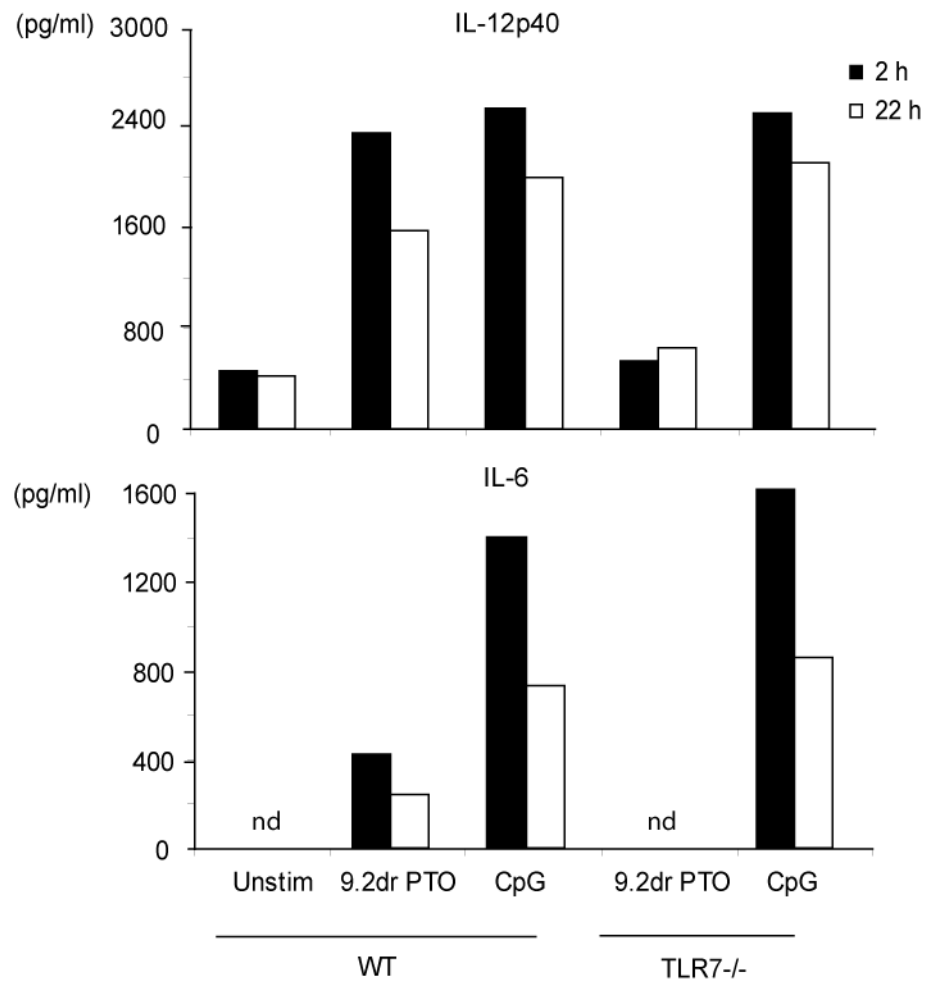
#### 4.1.5 TLR7-abhängige Zytokinproduktion

RNA viralen Ursprungs wird von einer Reihe von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt [Alexopoulou et al. 2001; Katze et al. 1991; Yoneyama et al. 2004; Hornung et al. 2005]. Um zu prüfen, ob die Zytokinproduktion TLR7-abhängig ist, wurden BMDCs aus Wildtyp- und TLR7-Knockout-Mäusen mit immunstimulatorischer RNA inkubiert. Nach 6 Stunden befanden sich im Überstand der mit 9.2dr PTO-stimulierten Wildtyp-DCs IL-12p40 und IL-6 (s. Abb. 7). Nicht zu detektieren waren die Th2-Zytokine IL-10 und IL-4 (Daten nicht gezeigt). Im Überstand TLR7-defizienter DCs ließen sich keine Zytokine nachweisen. Poly A PTO induzierte weder in Wildtyp- noch in TLR7-defizienten BMDCs die Produktion proinflammatorischer Zytokine. Dagegen führte die Stimulation mit dem TLR9-Liganden CpG sowohl in Wildtyp- als auch in Knockout-DCs zur Produktion von IL-12p40 und IL-6.



**Abb. 7. ORN induzieren TLR7-abhängig die Produktion von Th1-Zytokinen *in vitro*.** BMDC aus Wildtyp- (WT) und Knockout-Mäusen (TLR7<sup>-/-</sup>) wurden für 6 h *in vitro* mit den angegebenen Oligonukleotiden (1 µg/ml) stimuliert. Anschließend wurden die Zytokine IL-12p40 und IL-6 im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Die Abb. zeigt die Mittelwerte aus Triplikaten  $\pm$  SEM. Der Versuch ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Anhand von Knockout-Mäusen wurde auch getestet, ob die Zytokinproduktion *in vivo* TLR7-abhängig ist. Dazu wurden Wildtyp- und TLR7-defizienten Mäusen 9.2dr PTO oder CpG gespritzt und die Zytokinkonzentration nach 2 und 22 Stunden im Serum bestimmt. Es zeigte sich auch hier eine eindeutig TLR7-abhängige Produktion der Th1-Zytokine IL-12p40 und IL-6 (s. Abb. 8). Dass TLR7-defiziente Mäuse aber grundsätzlich reagibel sind, zeigte sich an der Zytokinproduktion nach CpG-Stimulation, die vergleichbar war mit der von Wildtyp-Mäusen.



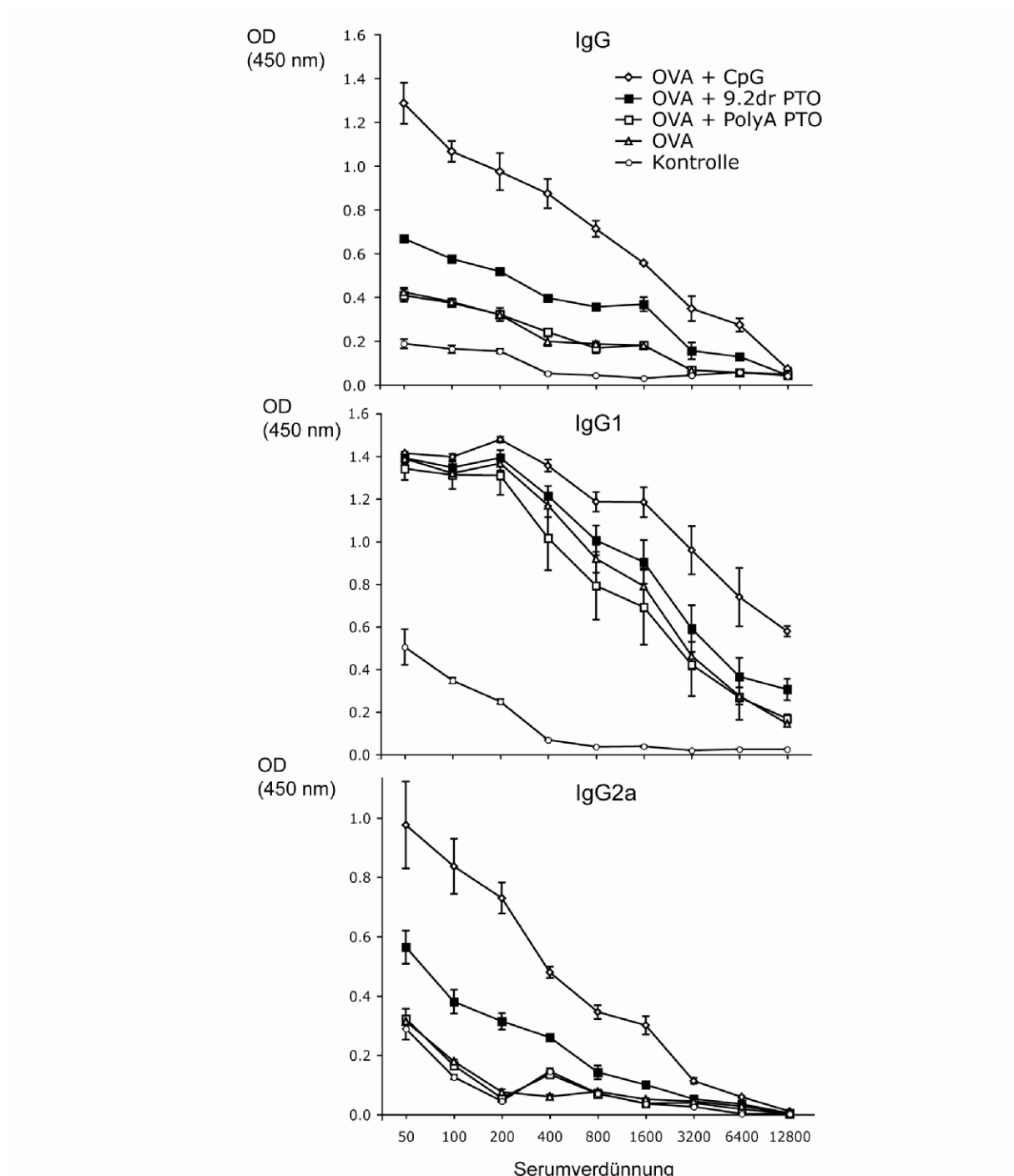
**Abb. 8. Die Produktion von Th1-Zytokinen *in vivo* ist TLR7-abhängig.** WT und TLR7<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit 20 µg 9.2dr PTO bzw. CpG behandelt. Nach 2 h und 22 h wurden die Zytokine IL-12p40 und IL-6 im Serum bestimmt. Abgebildet sind die Mittelwerte der Gruppen (n = 2) repräsentativ für zwei unabhängige Versuche. (nd = nicht detektierbar).

#### 4.1.6 Induktion einer Antigen-spezifischen zytotoxischen Immunantwort

In den vorhergehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass immunstimulatorische RNA-Oligonukleotide Antigen-unabhängig zur Aktivierung von dendritischen Zellen und Lymphozyten führen und dabei die Bildung von Th1-Zytokinen induzieren. Eine wesentliche Eigenschaft, die ein Adjuvans besitzen sollte, um in der Tumorummuntherapie eingesetzt zu werden, ist die Induktion einer Th1-Antwort mit Bildung Antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen. Der Einfluss von ORN auf die Bildung einer Antigen-spezifischen Antwort wurde im Folgenden getestet.

#### 4.1.6.1 Entstehung einer IgG2a-Immunantwort

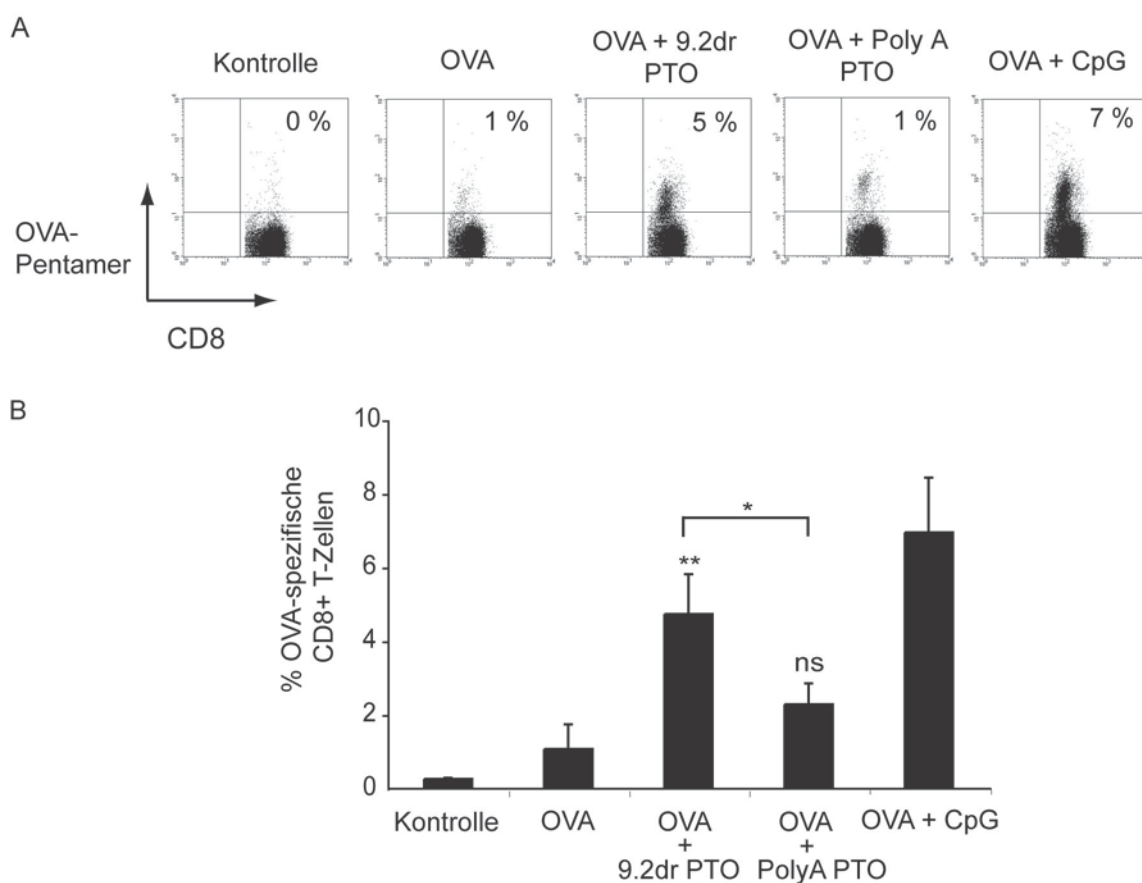
Um die Wirkung immunstimulatorischer RNA auf die Entwicklung einer antigen-spezifischen Immunantwort zu untersuchen, wurden Mäuse mit dem Modellantigen Ovalbumin (OVA) zusammen mit 9.2dr PTO oder Poly A PTO bzw. CpG zweimal in 14-tägigem Abstand immunisiert. Sieben Tage nach der letzten Immunisierung, wurden im Serum die Spiegel der gegen OVA gerichteten IgG-Antikörper gemessen. Die zusätzliche Immunisierung mit 9.2dr PTO führte zu einer stärkeren Erhöhung OVA-spezifischer IgG-Antikörper im Serum als die Immunisierung mit OVA alleine (s. Abb. 9). Poly A PTO potenzierte die Antikörperbildung dagegen nicht. CpG führte zu noch etwas höheren IgG-Spiegeln. Bei der Bildung spezifischer Antikörper des Isotyps IgG1, welcher im Rahmen einer Th2-Antwort gebildet wird [Hamm et al. 2007], zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen, in allen Gruppen wurde IgG1 im Vergleich zu den nichtimmunisierten Kontrollen erhöht. Dagegen wurde interessanterweise der Isotyp IgG2a, welcher eine Th1-Antwort indiziert [Seder und Paul 1994], nach Immunisierung mit OVA und CpG sowie mit OVA und 9.2dr PTO erhöht, jedoch nicht in Mäusen, die nur mit OVA oder OVA und PolyA PTO immunisiert wurden.



**Abb. 9. Immunstimulatorische RNA induziert die Bildung spezifischer Antikörper nach Immunisierung mit dem Antigen Ovalbumin.** Mäuse wurden dreimal s.c. immunisiert mit Ovalbumin (OVA) und RNA bzw. CpG. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden im Serum OVA-spezifische Antikörper IgG, IgG1 und IgG2a mittels ELISA gemessen. Das Serum wurde in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Die Daten zeigen die Mittelwerte der einzelnen Mäuse einer Gruppe (n = 5)  $\pm$  SEM. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

#### 4.1.6.2 Synergistische Steigerung der Frequenz Antigen-spezifischer T-Zellen

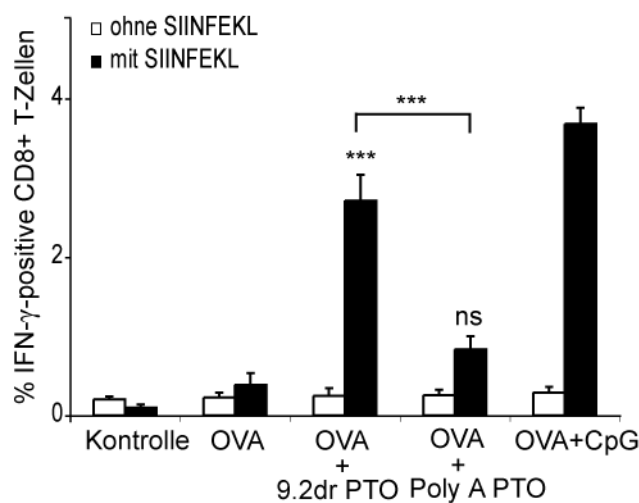
Neben der Bildung von IgG2a-Antikörpern durch B-Zellen ist ein wesentlicher Bestandteil der Entstehung einer antigen-spezifischen Immunantwort die Bildung antigen-spezifischer zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Daher wurde der Einfluss einer Immunisierung von Mäusen mit OVA und RNA auf die Entstehung OVA-spezifischer T-Zellen ermittelt. Während eine Immunisierung mit OVA alleine nur zu einem geringen Anstieg der MHC-I-Pentamer<sup>+</sup> OVA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen führte, wurden in Mäusen, die neben OVA zusätzlich mit 9.2dr PTO immunisiert wurden, über 4 % OVA-spezifische T-Zellen detektiert (s. Abb. 10 A und C). Der Wert für die Immunisierung mit CpG lag bei über 6 % spezifischer T-Zellen. Die Immunisierung mit Poly A PTO brachte keinen signifikanten Anstieg spezifischer T-Zellen im Vergleich zu einer Immunisierung mit OVA alleine.



**Abb. 10. Immunstimulatorische RNA fördert die Bildung antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen.** Mäuse wurden zweimal im Abstand von zwei Wochen mit OVA und RNA bzw. CpG immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden die Splenozyten isoliert und mittels FACS-Analyse auf OVA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. (A) Die Abb. zeigt die Prozentzahl OVA-Pentamer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen jeweils einer repräsentativen Maus pro Gruppe. (B) Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen (n = 4) +/- SEM. Die Daten sind repräsentativ für drei Experimente. (\*\* ohne Klammer = im Vergleich zur OVA-Gruppe).

#### 4.1.6.3 Erhöhung der Funktionalität Antigen-spezifischer T-Zellen

Um zu überprüfen, ob 9.2dr PTO auch die Funktionalität der antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen steigert, wurde zunächst deren Produktion von IFN- $\gamma$  bestimmt. Splenozyten immunisierter Mäuse wurden zu diesem Zweck mit OVA<sub>257-264</sub>-Peptid *ex vivo* restimuliert, und die IFN- $\gamma$ -Produktion wurde intrazellulär gemessen. Die Immunisierung mit 9.2dr PTO zusätzlich zu OVA erhöhte signifikant die Bildung von IFN- $\gamma$  in OVA-spezifischen T-Zellen im Vergleich zu einer Immunisierung nur mit OVA (s. Abb. 11 B und D). Der Anteil der spezifischen IFN- $\gamma$  positiven Zellen war vergleichbar mit dem Wert nach Immunisierung mit CpG und OVA. Poly A PTO zeigte als Adjuvans keine signifikante Wirkung.

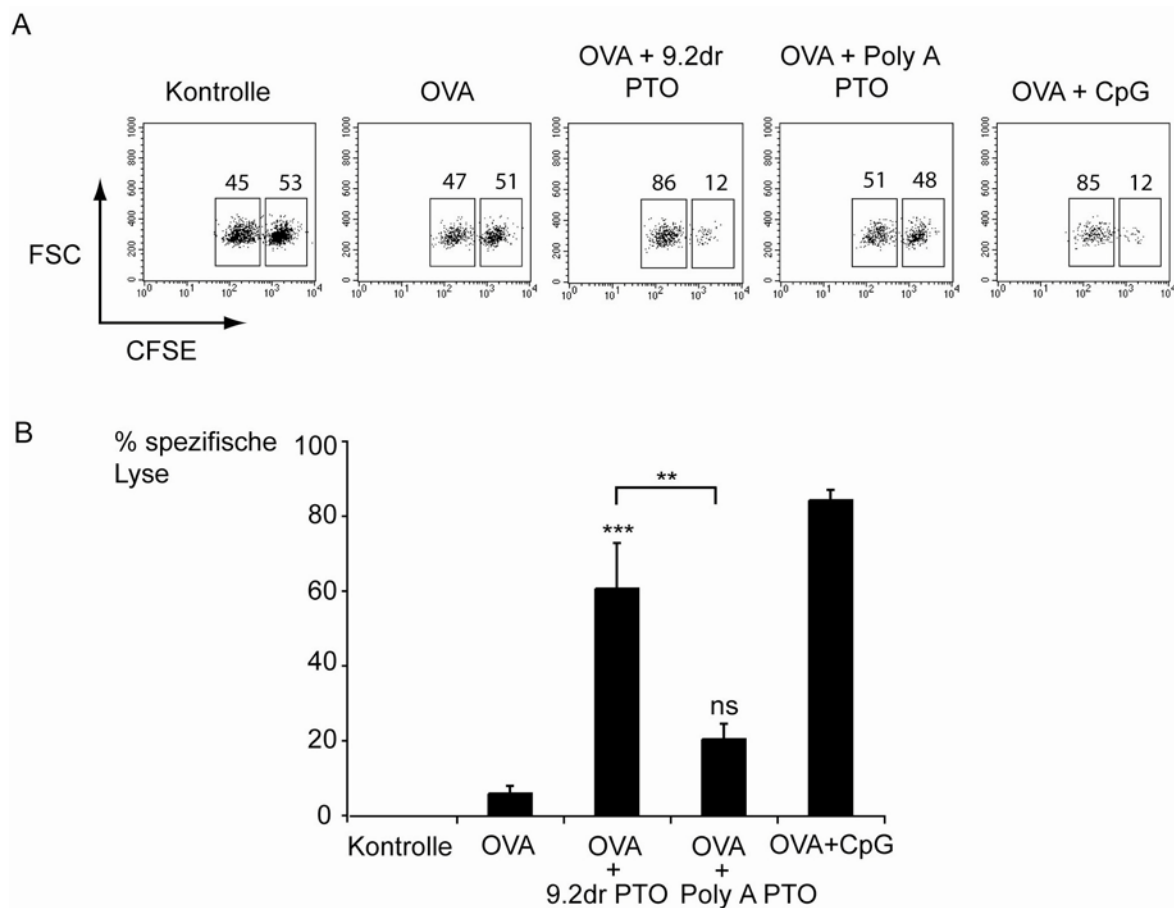


**Abb. 11. RNA-Oligonukleotide erhöhen die Interferon- $\gamma$ -Produktion in OVA-spezifischen T-Zellen.** Mäuse wurden immunisiert nach dem Schema in Abb. 10. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden die Splenozyten nochmals *ex vivo* mit SIINFEKL (OVA<sub>257-264</sub>-Peptid) restimuliert (schwarze Säulen). Als Kontrolle dienten Splenozyten, die nicht restimuliert wurden (weiße Säulen). Anschließend wurde die intrazelluläre Expression von Interferon- $\gamma$  in CD8<sup>+</sup> T-Zellen ermittelt. Die Abb. zeigt die Mittelwerte einzelner Mäuse einer Gruppe (n = 4)  $\pm$  SEM aus einem repräsentativen Versuch. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche. (\*\*\*) ohne Klammer = Vergleich zur OVA-Gruppe).

Als zweiter Parameter zur Bestimmung des Einflusses von 9.2dr PTO auf die Funktionalität spezifischer T-Zellen diente deren Zytotoxizität. Um diese zu untersuchen, wurde ein Zytotoxizitäts-Versuch *in vivo* durchgeführt. Hierfür wurden immunisierten Mäusen naive CFSE-markierte Splenozyten injiziert, die vorher mit OVA-Peptid beladen worden sind. Anschließend wurde die spezifische Lyse dieser Splenozyten berechnet. Unbeladene Splenozyten, die mit einer niedrigeren Konzentration an CFSE gefärbt waren, dienten als Referenz. Hier zeigte sich, dass 9.2dr PTO als Adjuvans eine deutlich erhöhte spezifische Lyse (60 %) induziert, während OVA alleine oder Poly A PTO und OVA die Lyse nicht signifikant erhöhten (s. Abb. 12). Der Wert für die Positivkontrolle CpG lag bei etwa 80 %.



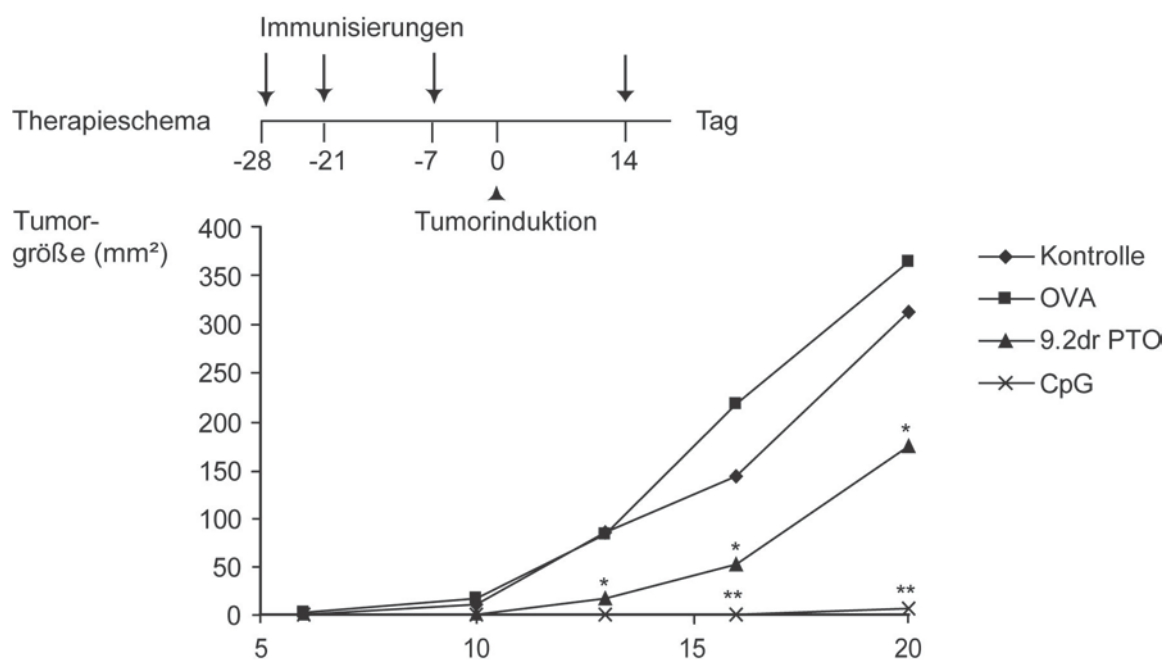
Als Adjuvans bei einer Immunisierung potenziert 9.2dr PTO damit signifikant die Entwicklung funktionaler antigen-spezifischer T-Zellen.



**Abb. 12. Immunstimulatorische RNA erhöht die Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo*.** Mäuse wurden mit OVA und ORN bzw. ODN zweimal im Abstand von zwei Wochen immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden Splenozyten isoliert. Die Zytotoxizität wurde *in vivo* bestimmt durch die spezifische Lyse CFSE-markierter Splenozyten, die mit OVA<sub>257-264</sub>-Peptid beladen waren, im Vergleich zu unbeladenen Splenozyten. Die Auswertung erfolgte mittels FACS-Analyse. (A) Die Zahlen über den Kästchen geben die Prozentzahl CFSE<sup>+</sup>-Zellen an, die mit Peptid beladen (rechte Kästchen, CFSE<sup>high</sup>) oder unbeladen sind (linke Kästchen, CFSE<sup>low</sup>). (B) Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM der Mäuse einer Gruppe (n = 3 für OVA+CpG und n = 5 für die anderen Gruppen). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuche. (\*\*\*) ohne Klammer = Vergleich zur OVA-Gruppe).

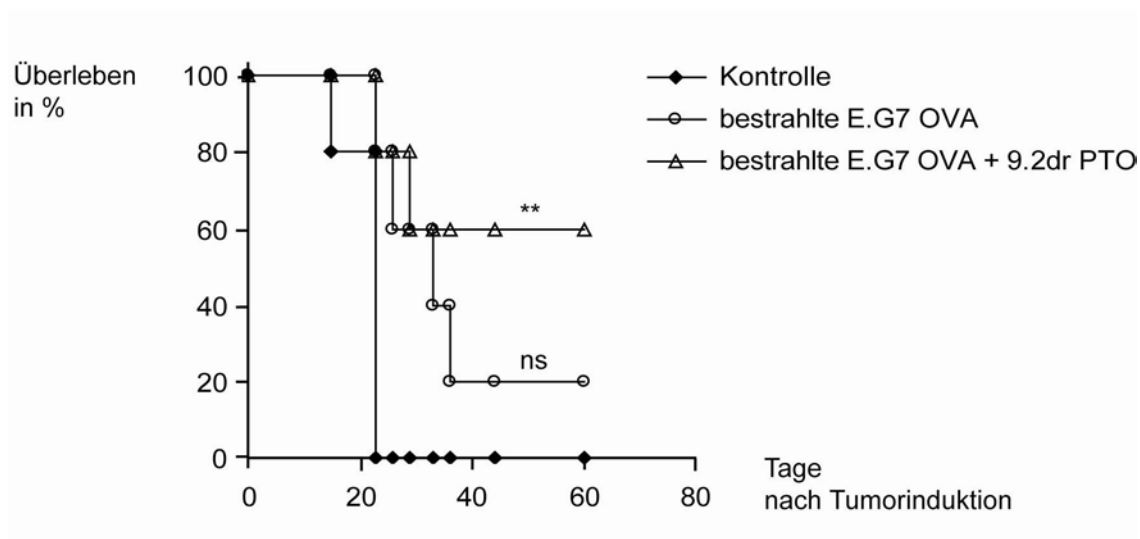
#### 4.1.6.4 Prophylaktische Immunisierung gegen Tumore

Nachdem sich zeigte, dass immunstimulatorische RNA-Oligonukleotide die zytotoxische Funktion von T-Zellen *in vivo* erhöhen, wurde nun der Einfluss auf das Tumorstadium geprüft. Dazu wurden Mäuse mit OVA und ORN bzw. ODN immunisiert bevor ein OVA-exprimierender Tumor der Linie E.G7 induziert wurde. Es zeigte sich, dass das Wachstum nach zusätzlicher Immunisierung mit 9.2dr PTO das Tumorstadium verlangsamte (s. Abb 13). Eine Immunisierung mit OVA alleine dagegen zeigte keinen Effekt. Die Immunisierung mit OVA und CpG verhinderte ebenfalls das Tumorstadium nicht, verlangsamte es aber deutlich.



**Abb. 13. Prophylaktische Immunisierung gegen Tumore.** Mäuse wurden dreimal nach abgebildetem Schema mit OVA und 9.2dr PTO bzw. CpG immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden OVA-exprimierende Tumorzellen der Linie E.G7 s.c. in die Flanke gespritzt. Eine weitere Immunisierung erfolgte an Tag 14 nach Tumorinduktion. Aufgetragen ist die durchschnittliche Tumorstadium jeder Gruppe. (\* im Vergleich zur OVA-Gruppe).

Da Tumore in der Regel mehrere Antigene tragen, kann die Immunisierung mit bestrahlten Tumorzellen eine effektive Methode darstellen, eine Immunantwort gegen diese Antigene zu induzieren. Nach Immunisierung mit bestrahlten E.G7-Zellen und 9.2dr PTO waren zu Versuchsende an Tag 60 noch drei von fünf Mäusen am Leben (s. Abb. 14). In der Gruppe, die nur mit bestrahlten Tumorzellen immunisiert wurde, war ab Tag 36 nur noch eine Maus am Leben. In der Kontrollgruppe, die nicht immunisiert wurde, mussten bereits bis Tag 23 alle Mäuse getötet werden.



**Abb. 14. Prophylaktische Immunisierung mit RNA und bestrahlten Tumorzellen.** Mäuse wurden prophylaktisch an Tag 0, Tag 14 und Tag 21 mit 9.2dr PTO und bestrahlten E.G7-Zellen immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung erfolgte die Tumorinduktion durch s.c. Injektion von E.G7-Zellen. Mäuse mit einer Tumorgroße über 225 mm<sup>2</sup> wurden getötet. Der prozentuale Anteil der lebenden Mäuse wurde bis Versuchsende an Tag 60 nach Tumorinduktion bestimmt (\*\* im Vergleich zur Kontrolle, n= 5).

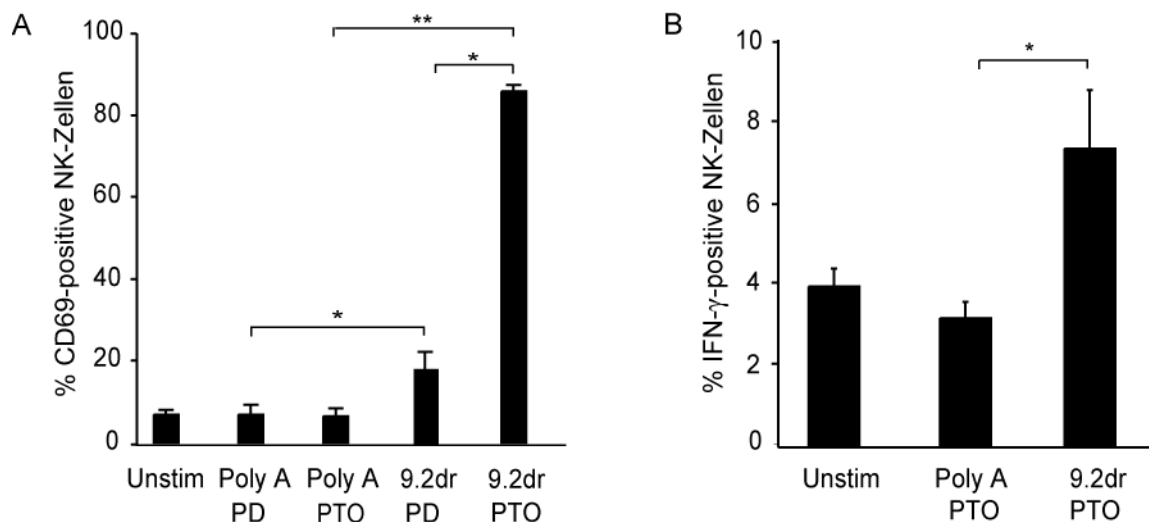
Immunstimulatorische RNA induziert damit eine effektive antigen-spezifische T-Zell-Antwort, die das Wachstum von Tumoren verlangsamt und mit einer besseren Prognose einhergeht.

## 4. 2. Induktion einer NK-Zell-Antwort

In den vorher beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass RNA-Oligonukleotide eine zytotoxische T-Zell-Antwort triggern. Da NK-Zellen eine weitere wesentliche Komponente der Tumorabwehr darstellen, ist es von Interesse zu untersuchen, ob ORN auch eine NK-Zell-Antwort auslösen können.

### 4.2.1 Induktion eines aktivierten NK-Zell-Phänotyps *in vivo*

Um den immunstimulatorischen Effekt auf NK-Zellen zu charakterisieren, wurden Mäusen RNA-Oligonukleotide i.v. gespritzt und die Aktivierung von NK-Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt. NK-Zellen wurden dabei als NK1.1<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>-Population festgelegt, um sie von NKT-Zellen (NK1.1<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>) zu unterscheiden. Eine einzelne Injektion von 9.2dr PTO resultierte bereits bei über 80 % der NK-Zellen in der Hochregulierung des Aktivierungsmarkers CD69 (s. Abb. 15 A). Auch nach Injektion von 9.2dr PD wurde die Expression von CD69 bei einigen NK-Zellen hoch reguliert. Poly A PD und Poly A PTO führten zu keiner signifikanten Aktivierung. Die Hintergrund-Aktivierung, das heißt die CD69-Expression ohne Stimulation, lag unter 10 %.

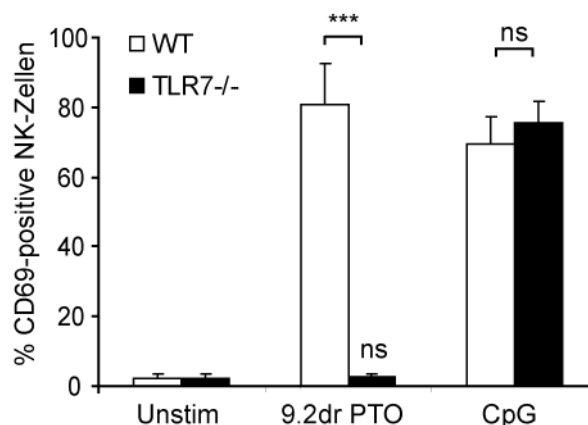


**Abb. 15. Immunstimulatorische ORN aktivieren NK-Zellen *in vivo*.** Mäusen wurden 20  $\mu$ g ORN mit PD- oder PTO-Rückgrat injiziert. (A) Die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 wurde 22 h nach Injektion mittels FACS-Analyse auf NK-Zellen (NK1.1<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>) gemessen. Die Daten zeigen die Mittelwerte der einzelnen Mäuse einer Gruppe  $\pm$  SEM (n = 3). Die Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Versuche. (B) 4 h nach Injektion wurde IFN- $\gamma$  intrazellulär in NK-Zellen gemessen. Abgebildet sind die Mittelwerte der Mäuse einer Gruppe (n = 6). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Darüber hinaus steigerte 9.2dr PTO bereits 4 Stunden nach Injektion die Produktion von IFN- $\gamma$  in NK-Zellen (s. Abb. 15 B). Interessanterweise wurde dieser Anstieg der IFN- $\gamma$ -Produktion direkt *ex vivo* beobachtet, ohne dass eine Restimulation der NK-Zellen mit Targetzellen nötig war. Wie erwartet führte Poly A PTO zu keiner erhöhten IFN- $\gamma$ -Produktion.

#### 4.2.2 TLR7-abhängige NK-Zell-Aktivierung *in vivo*

Um zu testen, ob die Aktivierung von NK-Zellen durch immunstimulatorische RNA TLR7-abhängig ist, wurde TLR7-defizienten und Wildtyp-Mäusen jeweils 9.2dr PTO i.v. injiziert. NK-Zellen TLR7-defizienter Mäuse reagierten im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen darauf nicht mit einer erhöhten Expression von CD69 (s. Abb. 16). Auf Injektion des TLR9-Liganden CpG zeigten jedoch über 80 % der TLR7-defizienten NK-Zellen eine CD69-Expression. Dies zeigt, dass TLR7-defiziente NK-Zellen auf Stimulation durch einen anderen TLR reagieren können.

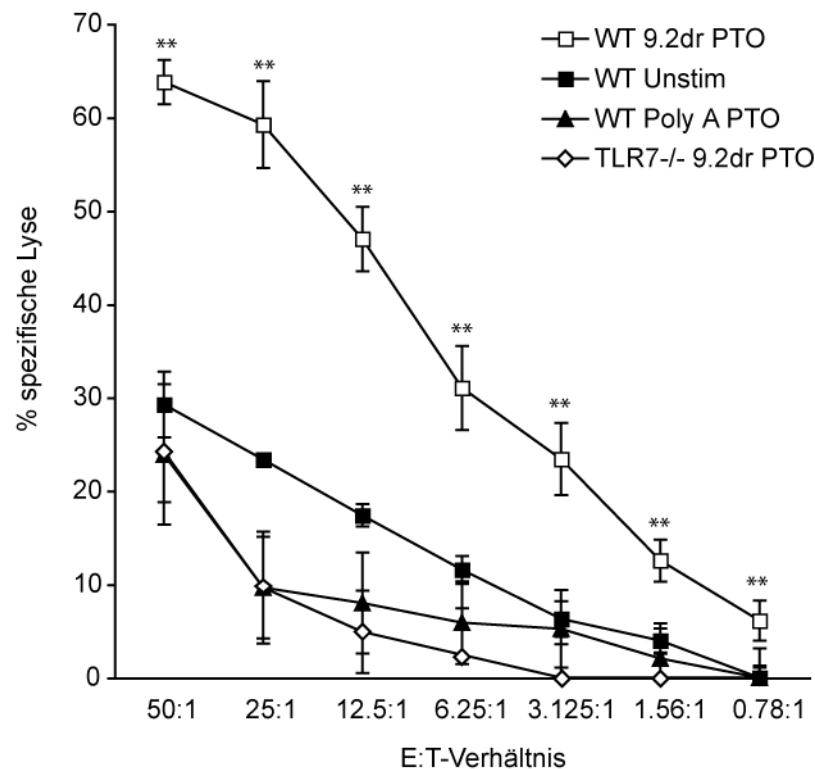


**Abb. 16. Die Aktivierung von NK-Zellen durch immunstimulatorische RNA ist TLR7-abhängig.** Wildtyp- (WT) und TLR7-defiziente (TLR7<sup>-/-</sup>) Mäuse wurden wie in Abb. 11 mit 9.2dr PTO oder CpG behandelt. Dargestellt ist die CD69-Expression als Mittelwerte der einzelnen Mäuse einer Gruppe (n = 3)  $\pm$  SEM. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

#### 4.2.3 TLR7-abhängige Induktion der Zytotoxizität

Eine wichtige Effektorfunktion von NK-Zellen ist die Zytotoxizität. Vier Stunden nach Injektion von 9.2dr PTO erhöhte sich TLR7-abhängig die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen. NK-Zellen, die aus 9.2dr PTO-behandelten Wildtyp-Mäusen isoliert wurden, wiesen *ex vivo* eine spezifische Lyse von über 60 % gegen NK-sensitive YAC-1-Zellen auf (s. Abb. 17). NK-Zellen TLR7-defizienter Mäuse zeigten dagegen keine erhöhte

zytotoxische Funktion. Die spezifische Lyse war auf dem selben Niveau wie die von NK-Zellen Poly A PTO-behandelter Wildtyp-Mäuse. Hier konnte gezeigt werden, dass immunstimulatorische RNA TLR7-abhängig eine Effektorantwort von NK-Zellen induziert. In unserer Abteilung konnte darüber hinaus beobachtet werden, dass ORN das Wachstum NK-sensitiver Tumore verlangsamen können.

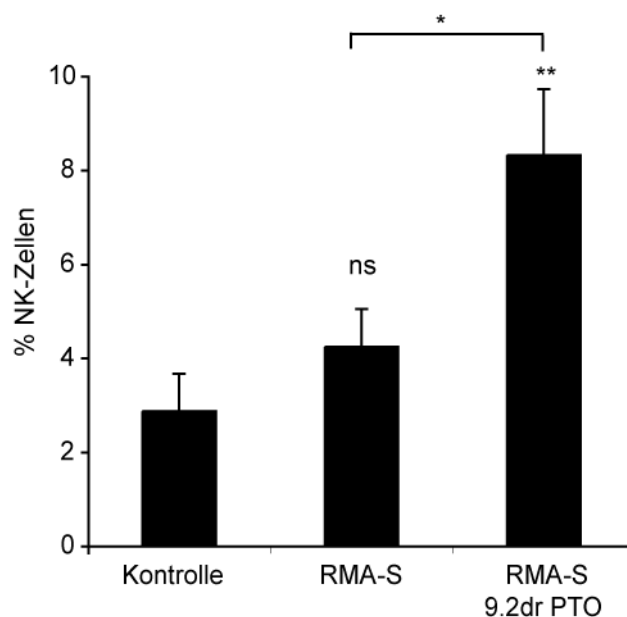


**Abb. 17. Immunstimulatorische RNA induziert TLR7-abhängig die Zytotoxizität von NK-Zellen.** 4 h nach RNA-Injektion in WT- und TLR7-/- -Mäuse wurden NK-Zellen isoliert. Die Zytotoxizität gegen YAC-1-Zellen wurde *ex vivo* im angegebenen Verhältnis Effektor-zu Targetzellen (E:T) bestimmt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus Triplikaten +/- SEM. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche. (\*\* im Vergleich zu TLR7-/- 9.2dr PTO).

#### 4.2.4 Erhöhung des Anteils tumorinfiltrierender NK-Zellen

Eine Voraussetzung für die Elimination von Tumorzellen durch NK-Zellen ist, dass NK-Zellen in die Tumorumgebung einwandern müssen. Um zu testen, ob immunstimulatorische RNA das Migrationsverhalten der NK-Zellen erhöhen kann, wurden 9.2dr PTO-behandelten Mäusen NK-sensitive RMA-S-Zellen injiziert. Der Anteil der in die Peritonealhöhle eingewanderten NK-Zellen wurde mittels FACS-Analyse nach Peritoneallavage bestimmt. Mäuse, die vor Injektion der Tumorzellen mit 9.2dr PTO behandelt wurden, wiesen einen fast doppelt so großen Anteil an NK-Zellen in der

Peritonealflüssigkeit auf als Mäuse, denen nur Tumorzellen gespritzt wurden (s. Abb. 18). Ohne 9.2dr PTO erhöhte sich der Anteil an eingewanderten NK-Zellen im Vergleich zu naiven Mäusen nicht signifikant.



**Abb. 18. Immunstimulatorische RNA erhöht den Anteil an NK-Zellen im Tumormilieu.** Mäusen wurden NK-sensitive RMA-S-Zellen gespritzt oder blieben unbehandelt. Mäuse, denen Tumorzellen gespritzt wurden, waren entweder naiv oder 22 h zuvor mit 20 µg 9.2dr PTO i.v. behandelt worden. 12 h nach Injektion der Tumorzellen wurde eine Peritoneallavage durchgeführt und der Anteil der NK-Zellen (bezogen auf kleine Lymphozyten) mittels FACS-Analyse bestimmt. Dargestellt die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 5). Der versuch ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

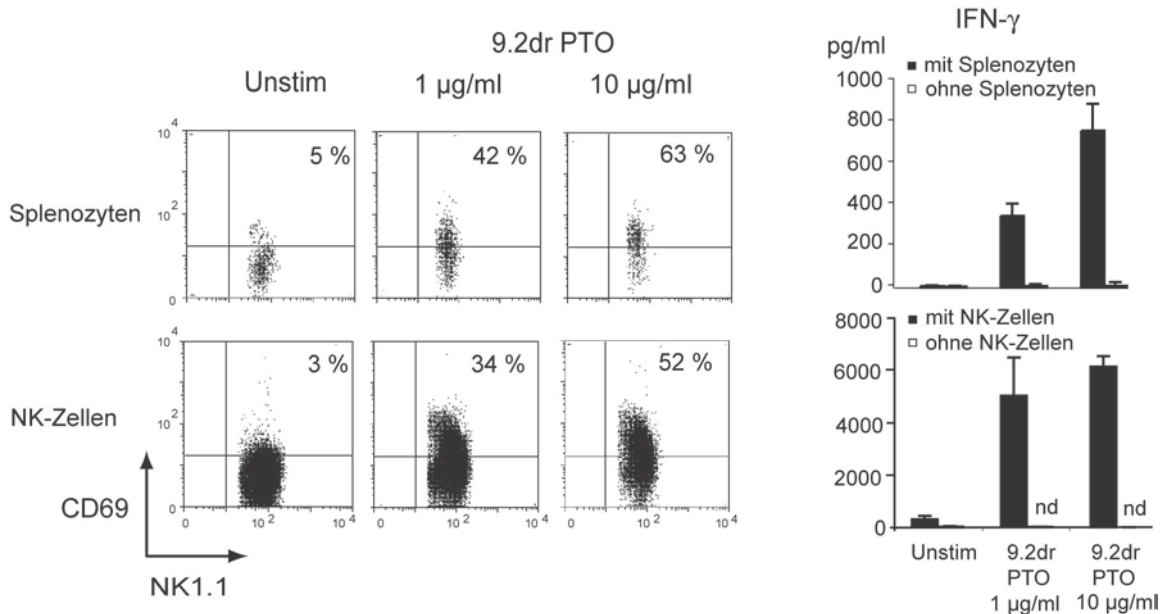
#### 4.2.5 DC-vermittelte Aktivierung von NK-Zellen

Auf die Frage, welche TLR-Agonisten NK-Zellen direkt oder indirekt stimulieren, liefert die Literatur sowohl für das murine als auch das humane System kontroverse Lösungsansätze [Lauzon et al. 2006; Gorski et al. 2006; Zanoni et al. 2005]. Hier sollte deshalb untersucht werden, ob immunstimulatorische RNA NK-Zellen direkt oder über akzessorische Zellen aktiviert. Da NK-Zellen durch DCs aktiviert werden können [Granucci et al. 2004; Fernandez et al. 1999], wurde die Rolle dendritischer Zellen bei der NK-Zellaktivierung beleuchtet.

##### 4.2.5.1 Abhängigkeit der NK-Zell-Aktivierung von dendritischen Zellen

Es wurden zunächst aufgereinigte NK-Zellen mit 9.2dr PTO-stimulierten BMDCs kokultiviert. Nach 18 Stunden Kokultur indizierte eine deutliche Hochregulierung der CD69-Expression sowie eine hohe IFN- $\gamma$ -Produktion die Aktivierung der NK-Zellen (s. Abb. 19 unten). Der Effekt war dabei dosisabhängig. NK-Zellen, die dagegen im

gesamten Splenozytenverband mit BMDCs kokultiviert wurden, zeigten eine etwas höhere CD69-Expression, jedoch eine geringere IFN- $\gamma$ -Produktion (s. Abb. 19 oben). DCs können damit eine indirekte Wirkung immunstimulatorischer RNA auf NK-Zellen vermitteln.

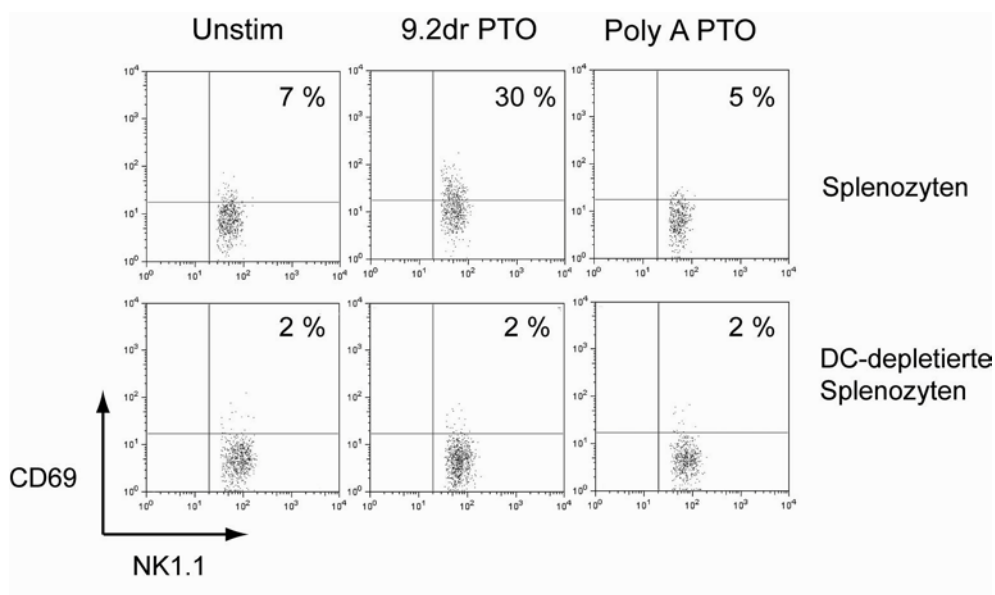


**Abb. 19. BMDCs aktivieren NK-Zellen zur Interferon- $\gamma$ -Produktion.** BMDCs wurden für 6 h mit 9.2dr PTO stimuliert, gewaschen und mit Splenozyten (oben) oder aufgereinigten NK-Zellen (unten) für 18 h kokultiviert. Nach Kokultur wurde die CD69-Expression der NK-Zellen (links) gemessen und die Konzentration an IFN- $\gamma$  im Überstand (rechts) bestimmt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Um zu überprüfen, ob NK-Zellen nur in Anwesenheit dendritischer Zellen aktiviert werden, wurden gesamte Splenozyten und CD11c-depletierte Splenozyten mit 9.2dr PTO bzw. Poly A PTO stimuliert. 6 h nach Stimulation mit 9.2dr PTO wurde CD69 nur bei den NK-Zellen hochreguliert, die sich im Kontext der gesamten Splenozyten befanden (s. Abb. 20). Der Anteil CD69-positiver NK-Zellen in CD11c-depletierten Splenozyten nach Stimulation mit 9.2dr PTO war nicht größer als der Anteil in der unstimulierten Gruppe. Poly A PTO hatte keine immunstimulatorische Wirkung auf die NK-Zellen, weder in CD11c-depletierten noch in undepletierten Splenozyten.

Demnach sind DCs für die immunstimulatorische Wirkung von RNA-Oligonukleotiden auf NK-Zellen notwendig und auch ausreichend.

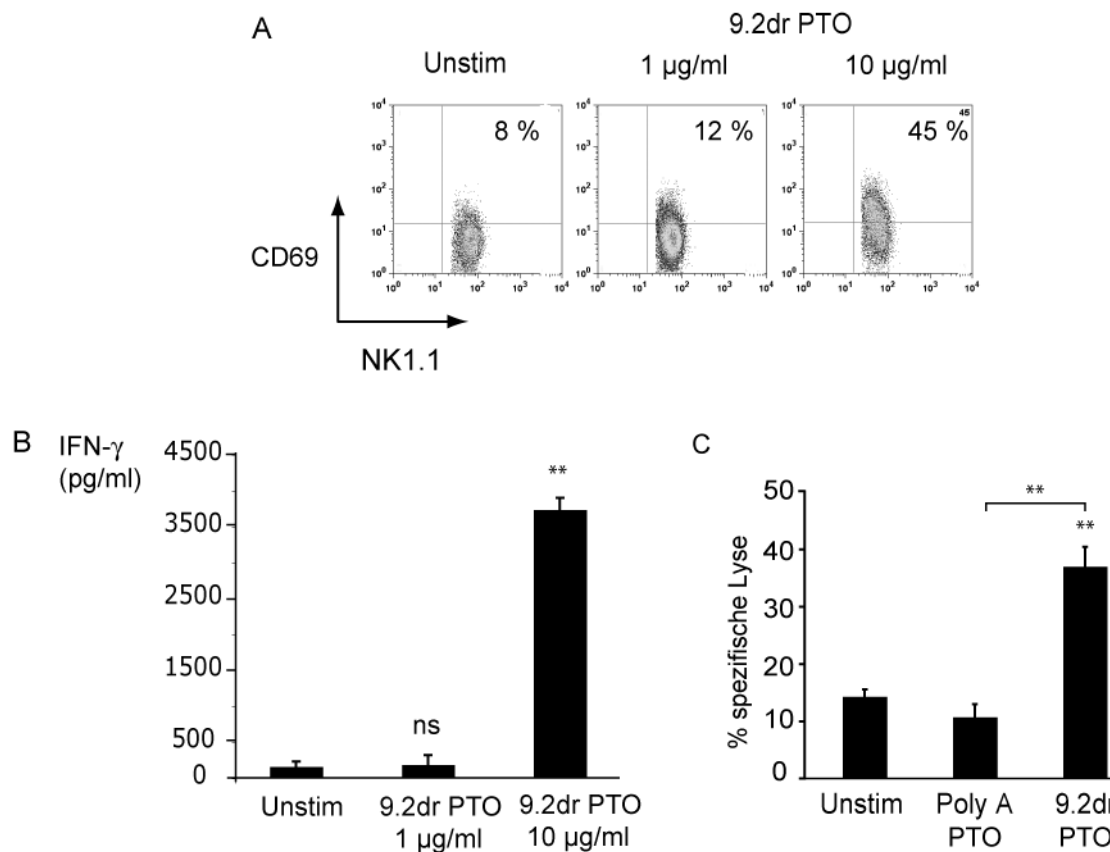




**Abb. 20. DCs sind nötig für die Aktivierung von NK-Zellen.** Gesamte Splenozyten und CD11c-depletierte Splenozyten wurden mit RNA-Oligonukleotiden stimuliert (1 µg/ml). Nach 6 h wurde die CD69-Expression der NK-Zellen analysiert. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs von zwei unabhängigen Versuchen.

#### 4.2.5.2 Aktivierung von NK-Zellen durch Zytokine dendritischer Zellen

Um zu überprüfen, ob Zytokine an der Aktivierung von NK-Zellen beteiligt sind, wurden aufgereinigte NK-Zellen mit dem Überstand RNA-stimulierter BMDCs inkubiert. Dazu wurden BMDCs zunächst *in vitro* stimuliert, gewaschen und für weitere 18 Stunden kultiviert. Der abgenommene Überstand wurde dann zu NK-Zellen gegeben. Der Überstand stimulierter DCs führte zur Hochregulierung der CD69-Expression (s. Abb. 21 A). Diese war dosisabhängig. Der Überstand unstimulierter DCs dagegen führte zu keiner Aktivierung. Darüber hinaus führte der Überstand von DCs, die mit der höheren Konzentration stimuliert wurden, zur Bildung funktionaler NK-Zellen mit erhöhter IFN- $\gamma$ -Produktion und zytotoxischer Aktivität (s. Abb. 21 B und C).

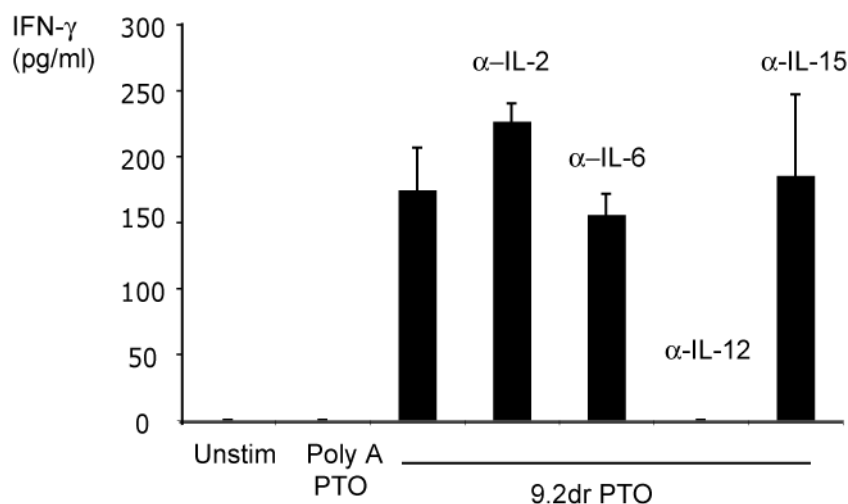


**Abb. 21. Zytokine ORN-stimulierter BMDCs aktivieren NK-Zellen.** BMDC wurden mit ORN der angegebenen Konzentrationen (A und B, Konzentration für C 10 µg/ml) für 6 h stimuliert, gewaschen und für weitere 18 h kultiviert. Aufgereinigte NK-Zellen wurden anschließend mit dem Überstand der ORN-stimulierten BMDCs inkubiert. Nach 18 h wurden die CD69-Expression (A), die Konzentration an IFN-γ im Überstand (B) und die zytotoxische Aktivität gegen YAC-1-Zellen (E:T 12,5:1) (C) ermittelt. Die Daten sind repräsentativ für je zwei unabhängige Versuche.

#### 4.2.5.3 IL-12 als Schlüsselzytokin der RNA-vermittelten Interferon-γ-Produktion

In der Literatur wird kontrovers beschrieben, welche Zytokine für die Aktivierung von humanen und murinen NK-Zellen maßgeblich verantwortlich sind [Gorski et al. 2006; Ferlazzo et al. 2004; Granucci et al. 2004; Nguyen et al. 2002]. Wie oben beschrieben werden NK-Zellen durch Zytokine RNA-stimulierter BMDCs aktiviert. Im Überstand von BMDCs ließen sich IL-12p40 und IL-6 nachweisen (s.oben). Nicht zu detektieren waren IL-2 und IFN-α (Daten nicht gezeigt). Da die im ELISA bestimmte Proteinmenge eines Zytokins jedoch nicht unbedingt mit seiner biologischen Funktion korreliert, wurden Hemmungsexperimente durchgeführt, bei denen die funktionelle Aktivität der Zytokine im Überstand der DCs mit monoklonalen Antikörpern geblockt wurde. Verwendet wurden neben Antikörpern gegen IL-12 und IL-6 auch Antikörper gegen IL-15 und IL-2, welche in der Literatur auch als NK-wirksame Zytokine beschrieben sind [Ferlazzo et al. 2004]. NK-

Zellen wurden anschließend mit dem Überstand inkubiert. Interessanterweise wurde die IFN- $\gamma$ -Produktion dabei nur durch anti-IL-12-Antikörper vollständig inhibiert (s. Abb. 22). Bei Verwendung der anderen Antikörper blieb die Konzentration von IFN- $\gamma$  auf dem gleichen Niveau wie die Positivkontrolle. Damit schien die IFN- $\gamma$  Produktion der NK-Zellen nur abhängig von IL-12. Anhand von Versuchen mit Knockout-Mäusen konnte in unserer Abteilung des Weiteren gezeigt werden, dass dies auch *in vivo* der Fall ist und dass die CD69-Expression und die Zytotoxizität von IFN- $\alpha$  abhängen.

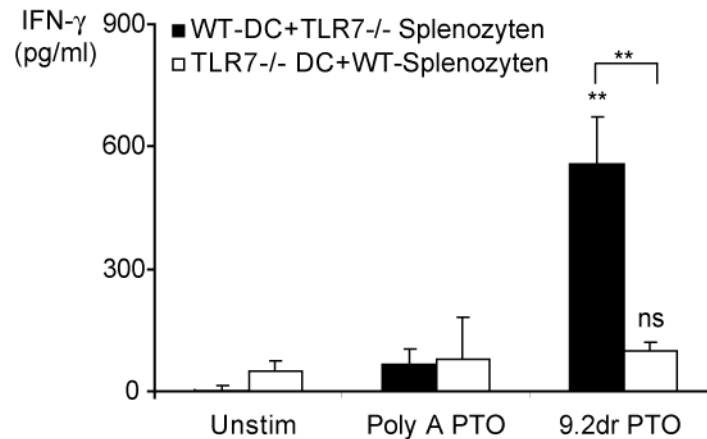


**Abb. 22. Das Blocken von Zytokinen dendritischer Zellen mittels monoklonaler Antikörper inhibiert die Interferon- $\gamma$  Produktion von NK- Zellen.** BMDCs wurden für 6 h mit 1  $\mu$ g/ml RNA stimuliert. Zytokine stimulierter BMDCs wurden geblockt mit monoklonalen Antikörpern gegen IL-2, IL-6, IL-12 und IL-15. Die Antikörper wurden bereits 2 h vor Stimulation zu den DCs gegeben. Splenozyten wurden für 18 h in dem Überstand kultiviert. Anschließend wurde die Interferon- $\gamma$ -Produktion mittels ELISA gemessen. Das Ergebnis zeigt die Mittelwerte aus Triplikaten  $\pm$  SEM und ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

#### 4.2.5.4 DC-vermittelte Aktivierung von NK-Zellen *in vivo*

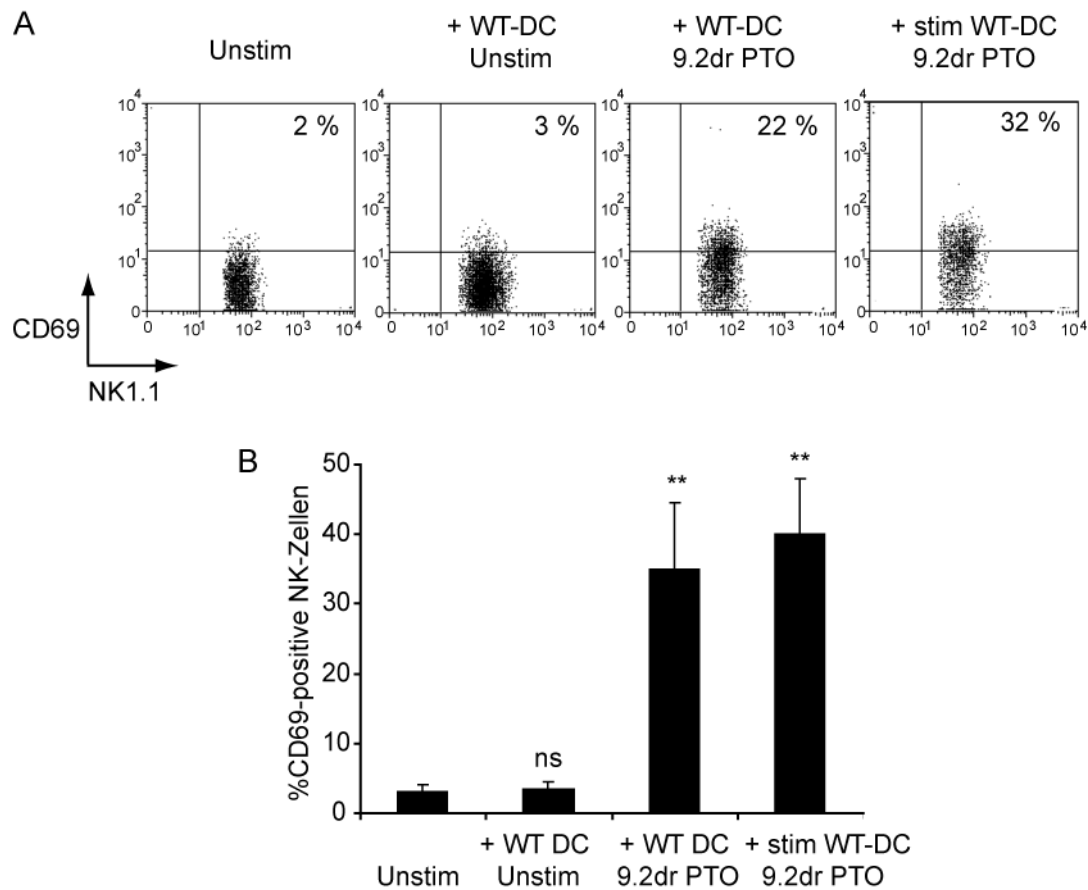
In den oben beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass DCs die Aktivierung von NK-Zellen durch RNA-Oligonukleotide *in vitro* vermitteln. Um nun die Rolle der DCs bei der RNA-vermittelten Wirkung auf NK-Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Versuch etabliert, der die bisherigen Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation übertragen sollte. Dazu wurde zunächst noch ein Vorversuch *in vitro* durchgeführt. BMDCs aus Wildtyp- und TLR7-defizienten Mäusen wurden mit ORN stimuliert und mit Wildtyp- oder TLR7-defizienten Splenozyten kokultiviert. Es zeigte sich, dass Wildtyp-DCs, die mit 9.2dr PTO stimuliert wurden, die Produktion von IFN- $\gamma$  in TLR7-defizienten Splenozyten induzieren (s. Abb. 23). Die Stimulation TLR7-defizienter DCs resultierte dagegen nicht in der IFN- $\gamma$

Produktion in Wildtyp-Splenozyten. Es zeigte sich somit, dass Wildtyp-DCs die immunstimulatorische Wirkung von RNA auf TLR7-defiziente Splenozyten vermitteln können.



**Abb. 23. Wildtyp-DCs können die Wirkung immunstimulatorischer RNA auf NK-Zellen *in vitro* vermitteln.** WT- und TLR7-/- BMDCs wurden für 6 h *in vitro* stimuliert, anschließend gewaschen und mit Splenozyten aus WT- oder TLR7-/- Mäusen kokultiviert. Nach 18 h Kokultur wurde Interferon- $\gamma$ -Konzentration im Überstand bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten  $\pm$  SEM. Der Versuch ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Um nun zu überprüfen, ob dies auch *in vivo* der Fall ist, wurden BMDCs aus dem Knochenmark naiver Wildtyp-Mäuse gewonnen und in TLR7-defiziente Mäuse transferiert. Diesen wurde anschließend 9.2dr PTO systemisch appliziert. Die CD69-Expression von NK-Zellen wurde in TLR7-defizienten Mäusen hoch reguliert, denen WT-BMDCs transferiert worden waren (s. Abb. 24). Wie oben dargestellt, zeigen TLR7-/- Mäuse ohne transferierte DCs keine Aktivierung (s. Abb. 16). *In vitro* Stimulation von DCs vor dem Transfer steigerte die Aktivierung zusätzlich. Transfer von DCs ohne ORN-Injektion induzierte keine Aktivierung. Damit ließ sich auch *in vivo* nachweisen, dass die Wirkung immunstimulatorischer RNA auf NK-Zellen durch DCs vermittelt werden kann.



**Abb. 24. Wildtyp-DCs vermitteln die Aktivierung TLR7-defizienter NK-Zellen durch ORN *in vivo*.** 2 h vor Injektion von 9.2dr PTO, wurden TLR7<sup>-/-</sup>-Mäusen  $5 \times 10^7$  WT-BMDCs transferiert. Die BMDCs waren entweder naiv oder *in vitro* für 6 h mit 1 µg/ml 9.2dr PTO stimuliert worden. 22 h nach RNA-Injektion wurde die CD69-Expression von NK-Zellen aus der Milz ermittelt. (A) Abgebildet ist eine repräsentative Maus pro Gruppe. (B) Dargestellt sind die Mittelwerte der Mäuse einer Gruppe (n = 3) +/- SEM.

## 5. DISKUSSION

### 5.1 Immunstimulatorische RNA

#### 5.1.1 Administration

Die Nukleinsäure-erkennenden TLRs 3, 7, 8 und 9 sind im Endosom der Zellen lokalisiert. Dies könnte eine evolutionäre Strategie darstellen, eine Aktivierung durch körpereigene Nukleinsäuren zu verhindern und somit eine Diskriminierung zwischen fremd und eigen zu ermöglichen. Eine wichtige Frage ist, wie man die Aufnahme immunstimulatorischer RNA-Moleküle in die Zelle und das Endosom verbessert. Eine Möglichkeit ist, die Oligonukleotide an ein Trägermaterial zu koppeln. Da RNA negativ geladen ist, ist für das Passieren der lipidhaltigen Zellmembran ein kationisches oder lipophiles Trägermaterial geeignet [Yasuda et al. 2005; Diebold et al. 2004; Heil et al. 2004]. In der vorliegenden Arbeit wurden hierfür RNA-Oligonukleotide mit dem kationischen Lipid DOTAP komplexiert. Für CpG-DNA ist beschrieben, dass die DOTAP-vermittelte Aufnahme in die Zelle ebenfalls wie die natürliche CpG-Internalisierung mittels Endozytose erfolgt [Yasuda et al. 2005]. Ein Unterschied scheint jedoch zu sein, dass die DOTAP-vermittelte Endozytose keiner Sättigung unterliegt, sodass mehr Nukleinsäure ins Endosom gelangt. Es wurde außerdem beschrieben, dass die Verwendung von Liposomen unabhängig von der Sequenz oder Struktur der Nukleinsäure eine immunstimulatorische Wirkung vermittelt [Yasuda et al. 2006]. Dies bestätigte sich in unseren Versuchen nicht. Wir beobachteten eine erhöhte Immunstimulation unter Verwendung von DOTAP. Jedoch war die immunstimulatorische Wirkung abhängig von der verwendeten RNA-Sequenz. Auch DOTAP selbst wirkte nicht immunstimulatorisch, diente also nur als Trägersubstanz.

Ein weiteres Reagenz, mit dem die Aufnahme von Nukleinsäure in Zellen verbessert wird, ist das kationische Polymer Polyethylenimin, erhältlich als jetPEI<sup>TM</sup> (Fa. Polyplus, New York, USA). Dies wird in der RNA-Interferenz-Technologie zum Einbringen von siRNA in die Zelle eingesetzt [Grzelinski et al. 2006; Urban-Klein et al. 2005]. In unserer Abteilung wurde es verwendet für eine immunstimulatorische siRNA, die den zytoplasmatischen Rezeptor RIG-I bindet. Der RNA/jetPEI<sup>TM</sup>-Komplex wird mittels Endozytose aufgenommen und induziert in der Zelle die Ruptur des Endosoms, sodass die RNA ins Zytosol freigesetzt wird. Systemisch applizierte RNA, komplexiert mit jetPEI<sup>TM</sup>, reichert sich dabei in verschiedenen Organen an [Poeck et al. 2008]. Eine andere Arbeitsgruppe beobachtete die spezifische Aufnahme von siRNA/PEI-Nanopartikeln in tumorassoziierte DCs [Cubillos-Ruiz et al. 2009].

Neuerdings werden auch kationische Nanopartikel auf Protamin- oder Gelatin-Basis zur Komplexierung von Nukleinsäuren eingesetzt [Zwiorek et al. 2008; Kerkmann et al. 2006]. Es wurde beobachtet, dass die Komplexierung von CpG mit Nanopartikeln die Antigen-spezifische Immunität potenziert und gleichzeitig die unspezifische systemische Immunstimulation verhindert. Dabei werden CpG-Nanopartikel gezielt zu den Antigen-präsentierenden Zellen transportiert [Bourquin et al. 2008].

#### 5.1.2 Rückgrat- und Sequenzabhängigkeit

Im Gegensatz zu immunstimulatorischen DNA-Sequenzen, sind RNA-Moleküle stark gefährdet, durch RNAsen abgebaut zu werden. Deshalb bedürfen RNA-Oligonukleotide einem Schutz vor Degradation durch RNAsen. Eine Möglichkeit stellt die Komplexierung der RNA mit oben beschriebenen Trägersubstanzen dar. Eine weitere Option ist die chemische Modifikation der RNA-Struktur [Lan et al. 2007; Scheel et al. 2004]. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu RNA-Oligonukleotide mit PTO-modifiziertem Rückgrat verwendet. PTO-Modifikation bedeutet, dass die freien Sauerstoffatome der Phosphatgruppen durch Schwefelatome ersetzt sind [Krieg 2002]. Da beschrieben ist, dass die Rückgratstruktur eine Rolle bei der Erkennung von RNA durch TLRs spielt [Haas et al. 2008], haben wir den Einfluss der Rückgratstruktur auf die immunstimulatorische Wirkung untersucht. Dazu wurden zwei Oligonukleotide der selben Sequenz 9.2dr einmal als PD und einmal PTO-modifiziert verglichen. Es zeigte sich, dass die PTO-Modifikation die Aktivierung von Lymphozyten, NK-Zellen und DCs sowie die Zytokinproduktion *in vivo* erhöht. 9.2dr PD führte zu einer geringen Aufregulierung von Aktivierungsmarkern auf lienalen DCs und NK-Zellen sowie zu erhöhten Spiegeln an IL-12p40. T- und B-Zellen wurden dagegen nur durch 9.2dr PTO aktiviert. Die Produktion von IFN- $\alpha$  und IL-6 wurde ebenfalls nur durch 9.2dr PTO induziert. Mit der PTO-modifizierten Kontrollsequenz wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch keinerlei immunstimulatorische Wirkung beobachtet. Es lässt sich hier also keine eigene immunstimulatorische Eigenschaft des PTO-Rückgrats feststellen. Das PTO-Rückgrat scheint vielmehr die RNA-Moleküle vor der Degradation durch Nukleasen zu schützen.

Zunächst wurde ssRNA viralen Ursprungs als TLR7- und TLR8-Ligand identifiziert. Eine spezifische Sequenz konnte jedoch nicht ausgemacht werden [Diebold et al. 2004; Lund et al. 2004; Scheel et al. 2004]. Heil et al. beschrieben, dass GU-Motive eine Rolle für die Erkennung durch TLR7 und 8 spielen könnten [Heil et al. 2004]. In unserer Abteilung wurde die immunstimulatorische Wirkung von siRNA entdeckt. Als besonders immunstimulatorisch stellte sich die Sequenz 9.2 (GUCCUCAA) heraus. Für diese Arbeit wurde die Sequenz 9.2dr verwendet, die das Motiv zweimal hintereinander getrennt durch

eine Uridin-Base enthält. Als Kontrollsequenz wurde Poly A eingesetzt. In allen *in vitro*- sowie *in vivo*-Versuchen zeigte sich eine klare Sequenzabhängigkeit unabhängig von der Rückgratstruktur, da Poly A weder als PD noch als PTO eine signifikante Immunstimulation auslöste.

### 5.1.3 RNA-erkennende Rezeptoren

RNA kann von einer Vielzahl an Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt werden. Lange dsRNA ist Ligand für TLR3 [Alexopoulou et al. 2001], für die Proteinkinase PKR [Katze et al. 1991], für das NALP3-Inflammasom [Kanneganti et al. 2006] sowie für die zytoplasmatischen RNA-Helikasen RIG-I [Yoneyama et al. 2004], MDA-5 [Andrejeva et al. 2004; Gitlin et al. 2006] und LGP-2 [Pippig et al. 2009]. Es wurde gezeigt, dass das 5`Triphosphat-Ende viraler RNA, das im Rahmen der *de novo* Transkription von RNA gebildet wird, der Ligand für RIG-I ist [Hornung et al. 2006; Pichlmair et al. 2006]. Kurze dsRNA wird von TLR7 erkannt [Hornung et al. 2005]. Virale ssRNA und kurze einzelsträngige siRNA-Moleküle wurden als TLR7- und 8-Ligand identifiziert [Heil et al. 2004; Diebold et al. 2004; Hornung et al. 2005]. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von TLR7-defizienten Mäusen die vollständige Abhängigkeit der 9.2dr-Oligonukleotide von TLR7 nachgewiesen. In TLR7-defizienten Mäusen wurde weder die Produktion proinflammatorischer Th1-Zytokine noch die Aktivierung von Immunzellen induziert. Dies zeigt, dass zytosolische Rezeptoren bei der Erkennung von 9.2dr keine Rolle spielen. Kürzlich wurde im humanen System gezeigt, dass die Erkennung von RNA durch TLR7 und RIG-I unterschiedliche Vorgänge auslöst. Während die TLR7-vermittelte RNA-Erkennung in pDCs die Produktion von IFN- $\alpha$  und in Monozyten die Bildung IL-12p70 auslöst, bewirkt die Erkennung von 5`Triphosphat-RNA durch RIG-I die Produktion von IFN- $\alpha$  in Monozyten. Es ergibt sich daraus, dass es entscheidend ist, wie RNA appliziert wird. Das heißt es muss die entsprechende Struktur und Trägersubstanz gewählt werden, je nachdem ob man den zytosolischen oder endosomalen Rezeptor stimulieren möchte [Ablasser et al. 2009].



## 5.2 Induktion einer Antigen-spezifischen T-Zell-Antwort

Ein wesentlicher Aspekt der immunologischen Abwehr von Infektionen und Tumoren ist die Ausbildung einer Antigen-spezifischen T-Zell-Antwort. Bei der Untersuchung tumorinfiltrierender T-Lymphozyten ist gezeigt worden, dass unterschiedliche T-Zell-Phänotypen sich verschieden auf das Tumorwachstum auswirken. So wurde festgestellt, dass ein vermehrter Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Kolonkarzinomen mit einer erhöhten Überlebensrate und die Hochregulation von Genen, die mit einer Th1-Antwort assoziiert sind, mit einem verminderten Rezidivrisiko einhergeht [Pages et al. 2005; Galon et al. 2006]. Eine vermehrte Zahl an T-regulatorischen Zellen im hepatozellulären Karzinom und im Mammakarzinom ging dagegen mit einem geringerem Überleben einher [Gao et al. 2007; Bates et al. 2006]. Die Ausbildung einer effektiven zytotoxischen Antwort wird durch DCs und Th1-Zytokine begünstigt.

### 5.2.1 „Bystander-Aktivierung“ von Lymphozyten

Die Untersuchung der immunstimulatorischen Wirkung der RNA-Oligonukleotide zeigte hier eine Aktivierung von plasmazytoiden und myeloiden dendritischen Zellen, welche sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die proinflammatorischen Zytokine IFN- $\alpha$ , IL-12p40 und IL-6 produzierten. Diese Zytokine spielen eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung einer angeborenen und erworbenen Typ-1 Immunität [Dunn et al. 2006; Trinchieri 2003]. Sie induzieren die Bildung weiterer Th1-Zytokine, wie IFN- $\gamma$ , und fördern damit die Differenzierung von Th1-Zellen und die Aktivierung spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Für IL-12 ist beschrieben, dass sowohl exogen zugeführtes als auch endogenes IL-12 die Elimination von Tumoren fördert [Nanni et al. 2001; Fallarino et al. 1996; Noguchi et al. 1996; Brunda et al. 1993].

Tatsächlich beobachteten wir nach Stimulation mit RNA-Oligonukleotiden eine DC-vermittelte Aktivierung von T- und B-Zellen und Produktion von IFN- $\gamma$  *in vitro*. Der Überstand einer DC-Kultur, also die gebildeten Zytokine, waren ausreichend, um Lymphozyten zu aktivieren. Auch die systemische Applikation der RNA *in vivo* führte zu einer erhöhten Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie auf B-Zellen. Dies wurde interessanterweise in Abwesenheit einer Verabreichung von Antigen beobachtet. T-Zell-Aktivierung, die nicht über T-Zell-Rezeptor (TZR)-gebundenes Antigen erfolgt, nennt man „Bystander-Aktivierung“. Über diese antigen-unabhängige T-Zell-Aktivierung wird kontrovers diskutiert [Bangs et al. 2006]. Kritiker vermuten, dass sie nur wenige Zellen betrifft bzw. dass es diese TZR-unabhängige Aktivierung nicht gibt. Es soll sich vielmehr um eine Kreuzreaktivität des TZR von

Peptiden ohne Strukturhomologie oder einen zweiten TZR handeln, der die T-Zellen aktiviert [Selin et al. 2006; Hemmer et al. 1998]. Wir beobachteten jedoch unter Verwendung von RNA-Oligonukleotiden eine Aktivierung der Mehrzahl der T-Zellen, die nur durch Zytokine vermittelt wurde. Auch für den TLR7- und 8-Liganden R848 sowie für andere TLR-Liganden ist die „*Bystander*-Aktivierung“ beschrieben [Kamath et al. 2005; Nogagi et al. 2005]. Dabei spielen IL-12- und IFN- $\alpha\beta$ -produzierende DCs sowie IFN- $\gamma$ -produzierende NK-Zellen eine entscheidende Rolle bei der antigen-unabhängigen Aktivierung von T-Zellen [Kamath et al. 2005]. Auch im humanen System konnte das Auftreten einer antigen-unabhängigen Aktivierung, vor allem von Gedächtnis-T-Zellen beobachtet werden [Bangs et al. 2009].

Die physiologische Bedeutung der „*Bystander*-Aktivierung“ ist noch nicht vollständig geklärt. Jedoch gibt es Daten, die Hinweise darauf geben, dass die „*Bystander*-Aktivierung“ einen Standby-Status von T-Zellen induziert. Dieser soll T-Zellen für eine schnelle Antwort beim Zusammentreffen mit Antigen vorbereiten. Ohne Antigen scheint sich die Apoptoserate der Zellen zu erhöhen [Bangs et al. 2009].

### 5.2.2 Antigen-spezifische Immunantwort

Von entscheidender Bedeutung für die Entstehung einer protektiven antiviralen oder antitumoralen Immunantwort ist die Ausbildung einer Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort (CTL). Die Bildung von CTL wird begünstigt durch die Aktivierung von DCs und die Produktion von Th1-Zytokinen. Diese potenzieren die Antigen-Präsentation und die Differenzierung von T-Zellen [Trinchieri 2003]. Neben der spezifischen T-Zell-Antwort reagieren auch B-Zellen auf Antigen. Sie produzieren spezifische Antikörper gegen das Antigen. Man unterscheidet mehrere Isotypen von IgG-Antikörpern. Während der IgG1-Subtyp charakteristisch für eine Th2-Antwort ist, indiziert der IgG2a-Subtyp eine Th1-Antwort [Seder und Paul 1994]. Eines der wirksamsten Vakzinierungs-Adjuvanzen in klinischen Studien ist CpG-DNA. Es ist bekannt, dass CpG-Oligonukleotide eine Th1-Antwort mit der Bildung von IgG2a-Antikörpern induzieren [Vasilakos et al. 2000].

Um eine Antigen-spezifische Immunantwort nachzuweisen, bedient man sich Modellantigenen. Für die vorliegende Arbeit wurde das Modellantigen Ovalbumin (OVA), ein Hühnereiprotein, verwendet. Es konnte hier gezeigt werden, dass die Injektion von RNA-Oligonukleotiden zusammen mit OVA in der Bildung von OVA-spezifischen IgG-Antikörpern des Isotyps IgG2a resultiert. Diese wurden -im Gegensatz zu IgG1-Antikörpern- nur in Anwesenheit von RNA-Oligonukleotiden induziert, jedoch nicht durch die Immunisierung mit OVA alleine. Hamm et al. haben dagegen die Bildung von IgG1-Antikörpern, aber nicht die Produktion von IgG2a nach Immunisierung mit RNA

beobachtet [Hamm et al. 2007]. Dies könnte jedoch daran liegen, dass Hamm et al. die kurzlebigeren RNA-Oligonukleotide ohne PTO-Modifikation verwendeten. Dadurch kann die RNA-Konzentration zu gering sein, um TLR7 ausreichend für die Bildung einer Th1-Antwort zu aktivieren [Hamm et al. 2007].

Wir haben des Weiteren gezeigt, dass die Injektion von RNA-Oligonukleotiden zusammen mit OVA antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen erzeugt. Diese sind funktional, da sie IFN- $\gamma$  produzieren und eine erhöhte Zytotoxizität *in vivo* aufweisen. CpG-Oligonukleotide sind bekannte potente Induktoren von CTL [Miconnet et al. 2002; Lipford et al. 1997]. In unserem Modell war die Prozentzahl der CTL, die durch RNA induziert wurde vergleichbar mit der nach Immunisierung mit CpG. Dies zeigt, dass RNA-Oligonukleotide bei einer Immunisierung mit Protein eine spezifische Antikörper-Reaktion auslösen können, die mit einer Th1-Antwort und der Bildung zytotoxischer T-Zellen assoziiert ist. Unsere Ergebnisse wurden von Westwood et al. bestätigt [Westwood et al. 2006]. Es konnte damit gezeigt werden, dass RNA-Oligonukleotide effektiv eine antigen-spezifische Immunantwort triggern.

Eine Antigen-spezifische Immunität ist entscheidend für die Abwehr von Pathogenen und Tumoren. Deshalb haben wir den Einfluss einer Immunisierung mit immunstimulatorischer RNA und OVA auf das Wachstum eines OVA-exprimierenden Tumors untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine prophylaktische Immunisierung mit RNA das Tumorstadium zwar nicht verhindert, jedoch aber verlangsamt. Eine prophylaktische Immunisierung mit RNA und bestrahlten Tumorzellen erhöhte die Überlebensrate der Tiere. Für CpG ist beschrieben, dass eine wiederholte therapeutische Anwendung mit peritumoralen Injektionen Tumorstadium und Überleben begünstigen [Heckelsmiller et al. 2002]. Scheel et al. konnten zeigen, dass auch immunstimulatorische mRNA bei therapeutischer Anwendung in Form von intratumoralen Injektionen eine Regression von murinen Gliomen induziert [Scheel et al. 2006]. Immunstimulatorische RNA könnte damit ein Potenzial als Adjuvans in der Tumorstadiumtherapie haben. Verstärken könnte man diese Wirkung, indem man immunstimulatorische RNA mit anderen Adjuvantien oder anderen etablierten Therapien kombiniert.

### 5.2.3 Regulation der zytotoxischen T-Zell-Antwort

Eine antigen-spezifische T-Zell-Antwort kann durch kürzlich entdeckte Subpopulationen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen reguliert werden. Dabei spielen sowohl proinflammatorische Th17-Zellen als auch supprimierende T-regulatorische Zellen (Treg) eine Rolle, die beide die Effektivität einer antitumoralen Immunantwort mindern können [Maloy et al. 2001; Langowski et al. 2006]. Die Rolle von Th17-Zellen ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt,

da ihre proinflammatorische Wirkung zwar mit einer Tumorprogression, jedoch aber auch mit der Bildung einer Th1-Antwort assoziiert zu sein scheint [Khader et al. 2007; Langowski et al. 2006]. Für die vorliegende Arbeit wurde der Einfluss immunstimulatorischer RNA auf die Regulation der T-Zell-Antwort zwar aus Gründen des Umfangs nicht untersucht. Der Vollständigkeit halber soll hier jedoch der mögliche Einfluss immunstimulatorischer RNA auf die Regulationsmechanismen der T-Zell-Antwort kurz skizziert werden. Th17- und Treg- Zellen entstehen beide unter dem Einfluss von TGF- $\beta$ . Für die Bildung von Th17-Zellen ist jedoch die zusätzliche Anwesenheit von IL-6 nötig, während die Differenzierung von Treg unter IL-2 erfolgt [Bettelli et al. 2008]. Da immunstimulatorische RNA die Bildung von IL-6, und nicht die von IL-2 induziert, ist anzunehmen, dass immunstimulatorische RNA eher die Entstehung von Th17-Zellen begünstigt. In unserer Abteilung konnte gezeigt werden, dass immunstimulatorische RNA die Funktion muriner Treg durch Aktivierung von TLR7 inhibiert [Anz et al. 2009]. Auch für das humane System wurde bereits interessanterweise gezeigt, dass unter den TLR-Liganden nur TLR8-Agonisten die Funktion von Tregs inhibiert. Dies konnte dadurch erklärt werden, dass humane Treg nur TLR8 und in geringem Maße TLR7, jedoch kein TLR9 exprimieren [Peng et al. 2005]. Somit könnte sich bei der Ausbildung einer effektiven antitumoralen T-Zell-Antwort ein wesentlicher Vorteil für immunstimulatorische RNA gegenüber dem TLR9-Liganden CpG ergeben.

### **5.3 Induktion einer NK-Zell-Antwort**

Eine zweite wesentliche Komponente der Abwehr von Pathogenen und Tumoren ist die Ausbildung einer effektiven NK-Zell-Antwort. NK-Zellen sind entscheidend an der Tumorummunsurveillance und der Prävention einer Dissemination von Metastasen beteiligt [Kim et al. 2007 und Kim et al. 2000]. Auch sie gehen wie zytotoxische T-Zellen mit einem erhöhten Überleben von Patienten mit Kolonkarzinomen einher [Coca et al. 1997].

#### **5.3.1 NK-Zell-Aktivierung**

In Abwesenheit einer Infektion ruhen NK-Zellen und besitzen einen naiven Phänotyp. Sie entwickeln nur geringe Effektorfunktion bei Kontakt mit Zielzellen [Vivier et al. 2008]. Um eine effektive NK-Zell-Antwort zu generieren, müssen NK-Zellen in zwei Schritten aktiviert werden. Zunächst werden sie im Rahmen einer Infektion durch verschiedene Zytokine oder direkten Kontakt mit akzessorischen Zellen voraktiviert [Lucas et al. 2007]. Anschließend müssen sie durch den Kontakt mit Targetzellen, die NK-aktivierende Rezeptoren exprimieren, restimuliert werden [Schleicher et al. 2007; Bryceson et al.

2006]. Wir konnten zeigen, dass eine systemische Applikation immunstimulatorischer RNA schnell zu einem aktivierten NK-Zell-Phänotyp führt. Dabei induziert immunstimulatorische RNA die Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD69, die Produktion von IFN- $\gamma$  und eine erhöhte zytolytische Aktivität. Dies sind wesentliche antitumorale Effektormechanismen [Vivier et al. 2008]. IFN- $\gamma$  ist zum einen an der Entstehung einer Th1-Antwort und Inhibition von Tregs beteiligt [Nishikawa et al. 2005], besitzt zum anderen aber auch antiangiogenetische und proapoptotische Wirkung [Meng et al. 2001; Bromberg et al. 1996; Luster et al. 1993]. Erhöhte Level an IFN- $\gamma$  wurden in klinischen Studien als begünstigend für das Überleben von Tumorpatienten beschrieben [Borg et al. 2004].

Besonders durch NK-Zellen angreifbar, sind Tumore mit Überexpression von Liganden für NK-stimulierende Rezeptoren wie NKG2D (*Natural killer group 2D*) oder mit Verlust des Oberflächenmoleküls MHC-I [Smyth et al. 2005; Chang et al. 2005]. Dies spielt vor allem eine Rolle im Rahmen der Immunsurveillance, da viele Tumore im *Escape*-Stadium die MHC-I-Expression herunter regulieren, um der T-Zell-Antwort zu entgehen. In unserer Abteilung konnte gezeigt werden, dass immunstimulatorische RNA das Wachstum eines murinen Lymphoms der Linie RMA-S, das kein MHC-1 exprimiert, deutlich verzögert [Bourquin und Schmidt et al. 2009]. Immunstimulatorische RNA induziert damit eine effektive antitumorale NK-Zell-Antwort, wodurch Tumorzellen eliminiert werden können, die einer T-Zell-Antwort entgehen. Das viel versprechende therapeutische Potenzial von TLR7- und 8-Agonisten wurde bereits am Beispiel von Imidazoquinolin-Komponenten gezeigt, die die Zytotoxizität von NK-Zellen gegen ein disseminierte murines Melanom induzieren [Dumitru et al. 2009]. In soliden Tumoren scheint die Injektion von Imiquimod jedoch nur lokal effektiv zu sein und keine effektive systemische antitumorale Wirkung zu induzieren [Broomfield et al. 2009]. Im humanen System erwies sich immunstimulatorische RNA bei der Aktivierung von NK-Zellen anderen TLR7- und 8-Agonisten als überlegen [Berger et al. 2009].

### 5.3.2 Zelluläre und molekulare Mechanismen der NK-Zell-Aktivierung

Humane NK-Zellen exprimieren verschiedene TLRs, jedoch ist nicht eindeutig geklärt, welche TLRs auch funktional sind. So wurde zwar mRNA für die TLRs 1-12 nachgewiesen, jedoch scheinen NK-Zellen vor allem durch TLR3 und 5 direkt aktiviert zu werden [Lauzon et al. 2005]. Effektiver ist die Aktivierung mittels akzessorischer Zellen wie Monozyten und DCs [Hart et al. 2005; Berger et al. 2009; Marshall et al. 2005]. Wir konnten hier zeigen, dass die Aktivierung von NK-Zellen durch immunstimulatorische RNA *in vivo* nicht direkt erfolgt, sondern von DCs vermittelt wird. Diese sind nötig und

ausreichend, um einen funktionalen NK-Zell-Phänotyp zu induzieren. Mittels Rekonstitution TLR7-defizienter Mäuse mit Wildtyp-DCs konnte die Aktivierung von NK-Zellen wieder erreicht werden. Unter den DC-Subpopulationen erwiesen sich mDCs als ausreichend für die NK-Zell-Aktivierung *in vivo*. Dies wurde auch für ein infektiöses Modell mit Leishmanien gezeigt [Schleicher et al. 2007].

Ein direkter Zell-Zell-Kontakt ist nicht obligat, da NK-Zellen durch den Überstand RNA-stimulierter mDCs aktiviert wurden. Verschiedene Zytokine, darunter IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 und IFN- $\alpha$  sind im Zusammenhang mit der Aktivierung von NK-Zellen beschrieben worden [Granucci et al. 2004; Qian et al. 2006; Nguyen et al. 2002; Sawaki et al. 2007]. Wir konnten zeigen, dass immunstimulatorische RNA *in vivo* die Produktion von IL-12 und IFN- $\alpha$  induziert. Eine Blockierung von Zytokinen im Überstand von mDCs mit monoklonalen Antikörpern zeigte, dass die Präsenz von IL-12 wesentlich für die Produktion von IFN- $\gamma$  ist. Entgegen den Beobachtungen von Borg et al. [Borg et al. 2004] war hier die Ausbildung einer Synapse zwischen NK-Zellen und DCs nicht erforderlich. In unserer Abteilung konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die Zytotoxizität von NK-Zellen von IFN- $\alpha$  abhängt [Bourquin und Schmidt et al. 2009]. Dies spielt eine wesentliche Rolle für die *in vivo* Voraktivierung von NK-Zellen in verschiedenen infektiösen Modellen [Lucas et al. 2007; Martinez et al. 2008]. Abhängig vom Erreger werden NK-Zellen direkt durch IFN- $\alpha$  [Martinez et al. 2008] oder mDCs aktiviert, die durch IFN- $\alpha$  zur Produktion von IL-15 stimuliert werden [Lucas et al. 2007]. Welche Zellen jedoch das für die NK-Zell-Aktivierung nötige IFN- $\alpha$  produzieren bleibt unklar. Denn interessanter Weise werden NK-Zellen auch nach Depletion von pDCs *in vivo* aktiviert, die ja die Hauptproduzenten von IFN- $\alpha$  sind [Schleicher et al. 2007]. Auch IL-2 wird als potentes Zytokin für die Aktivierung von NK-Zellen beschrieben [Granucci et al. 2004; Hart et al. 2005; Terme et al. 2008]. Im Überstand RNA-stimulierter mDCs konnte dies hier nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). IL-2 scheint nicht nur stimulierende Wirkung auf NK-Zellen auszuüben. Es kann die supprimierende Wirkung von T-regulatorischen Zellen auf NK-Zellen verstärken [Ghiringhelli et al. 2005] und deren Zelltod nach Gefäßendothelkontakt induzieren [Rodella et al. 2001].

## 5.4 Klinische Relevanz

### 5.4.1 T-Zellen in der Tumorimmuntherapie

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass immunstimulatorische RNA eine Typ-1 Immunität induziert mit Ausbildung von Th1-Zellen und Aktivierung von antigen-spezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Dies ist von entscheidender Bedeutung für die Entstehung einer antitumoralen Immunantwort. Direkter Beweis dafür liefern erste Ergebnisse der Infusion Antigen-spezifischer T-Zellen in Tumorpatienten [Dazzi et al. 2000; Lokhorst et al. 2000; Dudley et al. 2005]. Ein Charakteristikum entarteter Zellen ist die Expression bestimmter Moleküle, die sich von nicht entarteten Zellen unterscheiden. Durch diese Tumorantigene werden entartete Zellen angreifbar durch das Immunsystem. Verschiedene klinische Studien zielen auf Tumor-spezifische Antigene ab [Disis et al. 2008]. Eine Möglichkeit dabei ist die Vakzinierung mit Antigenen, die man nur gering im Aminosäuremotiv ändert, um die Bindung an MHC-I zu erhöhen, und damit eine effektive CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort zu induzieren [Parkhurst et al. 1996; Smyth et al. 2006]. Um den Effekt zu verstärken zielen Vakzinierungen auch auf MHC-II-Moleküle und damit auf die Ausbildung Antigen-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen ab [Cohen et al. 2000]. Eine wesentliche Rolle spielen dabei Antigen-präsentierende Zellen wie DCs [Van der Bruggen et al. 2006]. Diese können *ex vivo* mit Tumor-spezifischen Antigenen beladen und zur T-Zell-Stimulation in Patienten injiziert werden. Diese Methode resultierte in klinischen Studien in der Generierung einer Antigen-spezifischen Immunität sowie einer klinische Besserung, wenn auch nur in wenigen Patienten [Banchereau und Palucka 2005]. Vakzinierungen können in ihrer Effektivität verbessert werden, in dem man z.B. mit bestrahlten Tumorzellen immunisiert, um mehr Antigene abzudecken [Greten und Jaffee 1999], oder indem man Adjuvantien verwendet [Speiser et al. 2005]. Hier konnte gezeigt werden, dass immunstimulatorische RNA ein viel versprechendes Adjuvanz darstellen könnte.

### 5.4.2 NK-Zellen in der Tumorimmuntherapie

Neben der Ausbildung einer zytotoxischen T-Zell-Antwort induziert immunstimulatorische RNA eine effektive NK-Zell-Antwort. Das therapeutische Potenzial von Krebstherapien, die auf NK-Zellen abzielen, hat in den letzten Jahren immer größere Bedeutung angenommen. Nicht zuletzt, da die Infiltration von NK-Zellen in verschiedene Tumore mit einer besseren Prognose einher geht [Coca et al. 1997]. Die Mechanismen der NK-Zellwirkung beinhalten dabei neben Zytokinproduktion und Zytotoxizität auch die Expression kostimulatorischer Moleküle zur Aktivierung von T- und B-Zellen [Zingoni et al. 2004; Blanca et al. 2001]. Darüber hinaus induzieren NK-Zellen in Zusammenarbeit mit DCs eine zytotoxische T-Zell-Antwort unabhängig von Th-Zellen [Adam et al. 2005]. Sie

sind damit wichtige Mediatoren zwischen angeborener und erworbener Immunität. NK-Zellen lysieren bevorzugt Tumorzellen, die kein MHC-I mehr exprimieren und damit der T-Zell-Antwort entgehen [Chang et al. 2005]. Immunstimulatorische RNA, die sowohl die NK-Zell-Antwort als auch die T-Zell-Antwort unterstützt, stellt damit ein vielversprechendes Mittel dar, sowohl MHC-I-positive als auch MHC-I-negative Tumorzellen zu eliminieren. Immunstimulatorische RNA könnte dabei mit anderen Therapien kombiniert werden. In Betracht zu ziehen sind dabei zum Einen monoklonale Antikörper, die inhibierende Rezeptoren von NK-Zellen blockieren [Koh et al. 2001]. NK-Zellen sind zelluläre Mediatoren Antikörper-abhängiger zell-vermittelter Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC). Diese ist ein wichtiger Mechanismus für den therapeutischen Einsatz monoklonaler Antikörper gegen Tumorantigene [Carter et al. 2006]. Um die ADCC zu verstärken können bispezifische Antikörper mit zwei Antigenbindungsstellen verwendet werden, eine für das Tumorantigen und die andere für einen NK-Zellrezeptor [Shahied et al. 2004]. Weitere Therapeutika, die eine NK-Zellantwort triggern, beinhalten NK-Zell-Adjuvantien wie Zytokine oder lösliches *TRAIL* (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), das die Apoptose von Tumorzellen unabhängig von deren MHC-I-Expression vermittelt [Smyth et al. 2003], oder den Transfer voraktivierter NK-Zellen [Albertsson et al. 2003; Kim et al. 2000].

#### 5.4.3 Perspektive für den Einsatz immunstimulatorischer RNA

Dass TLR-Liganden ein therapeutisches Potenzial besitzen, wurde für CpG-Oligonukleotide und für Imidazoquinoline in klinischen Studien gezeigt. Während CpG bei Vakzinierungen gegen Hepatitis ein viel versprechendes Adjuvans darstellt [Cooper et al. 2004], sind die Erfolge in klinischen Studien zur Tumorthherapie bislang noch mäßig [Krieg 2008]. Ein Problem bei der Übertragung der Ergebnisse aus dem murinen auf das humane System ist das restriktive Expressionsmuster von TLR9 in humanen Zellen. TLR9 wird nur von humanen B-Zellen und pDCs exprimiert, jedoch nicht von Monozyten und mDCs [Iwasaki und Medhiztov 2004]. Dies bezüglich könnten TLR7- und 8-Liganden, welche auf all diesen Zellpopulationen exprimiert werden, einen klinischen Vorteil aufweisen. Eine antitumorale Wirkung der Hauptkomponente der Imidazoquinoline, Imiquimod, ist jedoch nur für die lokale Behandlung von Hauttumoren erwiesen [Bath-Hextall et al. 2004]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass immunstimulatorische RNA ein neues viel versprechendes Adjuvans darstellt, das eine antitumorale Wirkung durch Induktion einer effektiven T-Zell- und NK-Zell-Antwort aufweist. RNA-Oligonukleotide könnten als Monotherapie eingesetzt werden. Größere Effektivität könnte durch Kombination mit anderen TLR-Liganden [Napolitani et al. 2005;



Trinchieri und Sher 2007] oder oben beschriebenen Adjuvanzen erzielt werden. Darüber hinaus können RNA-Oligonukleotide so konstruiert werden, dass sie neben der immunologischen Wirkung auch andere antitumorale Effekte ausüben. 5`Triphosphat-RNA führt zum Einen über die Aktivierung von RIG-I zu einer antitumoralen Immunität. Zum Anderen kann die Einführung einer spezifischen inhibierenden siRNA-Sequenz die Expression von Tumor-assoziierten Genen verhindern [Poeck et al. 2008].

RNA-Oligonukleotide besitzen damit ein breites Spektrum direkter und indirekter antitumoraler Wirkungen. Auf Grund dieses pharmakologischen Wirkungsspektrums ergibt sich für RNA-Oligonukleotide ein vielversprechendes Potenzial im Einsatz in der Tumorimmuntherapie.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Erkennung von Pathogenen erfolgt durch verschiedene Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, von denen *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) wichtige Vertreter sind. Dass TLR-Liganden ein vielversprechendes therapeutisches Potenzial für die Immuntherapie besitzen, wurde für den TLR9-Agonisten CpG-DNA gezeigt. Kürzlich wurde beschrieben, dass immunstimulatorische Effekte auch durch kurze einzelsträngige RNA über TLR7 und 8 induziert werden können. Aufgrund des breiteren Expressionsmusters von TLR7 und 8 in humanen Zellen, könnten sich für RNA-Oligonukleotide große Vorteile in der klinischen Anwendung ergeben.

Zur Charakterisierung des immunstimulatorischen Potenzials von RNA-Oligonukleotiden wurde im ersten Teil der Arbeit die Wirkung auf die Ausbildung einer zytotoxischen T-Zell-Antwort untersucht. Die systemische Administration von RNA-Oligonukleotiden resultierte in der Aktivierung von dendritischen Zellen mit Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-12 und IFN- $\alpha$  sowie in der Aktivierung von B-Zellen und CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Dabei wurde die T-Zell-Aktivierung durch RNA-Oligonukleotide von dendritischen Zellen vermittelt. Die Immunisierung mit RNA-Oligonukleotiden zusammen mit einem Antigen induzierte die Ausbildung einer effektiven Antigen-spezifischen T-Zell-Antwort mit über 60 % spezifischer Zytotoxizität *in vivo* und verlangsamtem Tumorwachstum. Immunstimulatorische RNA könnte damit ein viel versprechendes Adjuvans in der Immuntherapie darstellen.

Der zweite Teil der Arbeit zeigt, dass RNA-Oligonukleotide zusätzlich eine angeborene Immunität induzieren, indem sie eine effektive NK-Zell-Antwort *in vivo* vermitteln. Über 80 % der NK-Zellen wiesen nach Behandlung mit immunstimulatorischer RNA einen aktivierten Phänotyp mit Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD69 auf. Zusätzlich erhöhten RNA-Oligonukleotide in NK-Zellen die Produktion von IFN- $\gamma$  sowie die zytotoxische Aktivität. Dies sind entscheidende antitumorale Mechanismen. Bei der Untersuchung der zellulären Mechanismen der NK-Zell-Aktivierung durch RNA-Oligonukleotide zeigte sich, dass eine indirekte Wirkung zu Grunde liegt, die durch dendritische Zellen vermittelt wird. Dies konnte auch *in vivo* gezeigt werden. Die Charakterisierung der molekularen Mechanismen ergab, dass die von dendritischen Zellen produzierten Zytokine IL-12 und IFN- $\alpha$  eine Schlüsselrolle bei der NK-Zell-Aktivierung spielen.

Die Wirkung von RNA-Oligonukleotiden ist sequenzabhängig, da eine Immunstimulation durch die Vergleichssequenz Poly A ausblieb. Einen stärkeren immunstimulatorischen Effekt erzielten Oligonukleotide mit PTO-Modifikation des RNA-Rückgrats, welche einen

Schutz vor der Degradation durch RNAsen zu bieten scheint. Die Verwendung TLR7-defizienter Mäuse konnte zeigen, dass die Wirkung durch TLR7 vermittelt wird.

Mit Aktivierung sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunität induzieren immunstimulatorische RNA-Oligonukleotide zwei entscheidende Mechanismen der Abwehr entarteter Zellen. Immunstimulatorische RNA könnte damit als Monotherapie, als Adjuvans oder in Kombination mit anderen antitumoralen Therapien, wie z.B. monoklonalen Antikörpern, die die NK-Zell-Zytotoxizität verstärken, Anwendung finden. Darüber hinaus können RNA-Oligonukleotide mit inhibierenden siRNA-Sequenzen versehen werden und damit zusätzliche antitumorale Wirkung durch Verhinderung der Expression tumor-assoziiierter Gene ausüben. Es ergibt sich somit für RNA-Oligonukleotide ein vielversprechendes breites antitumorales Wirkungsspektrum.

## 7. Literaturverzeichnis

- Ablasser A., Poeck H., Anz D., Berger M., Schlee M., Kim S., Bourquin C., Goutagny N., Jiang Z., Fitzgerald K. A., Rothenfusser S., Endres S., Hartmann G., Hornung V. Selection of molecular structure and delivery of RNA oligonucleotides to activate TLR7 versus TLR8 and to induce high amounts of IL-12p70 in primary human monocytes. *J Immunol* 2009; 182:6824-6833.
- Adam C., King S., Allgeier T., Braumueller H., Lueking C., Mysliwietz J., Kriegeskorte A., Busch D. H., Roecken M., Mocikat R. DC-NK cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* 2005; 106:338-244.
- Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124:783-801.
- Albertsson P. A., Basse P. H., Hokland M., Goldfarb R. H., Nagelkerke J. F., Nannmark U., Kuppen P. J. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol* 2003; 24:603-609.
- Alexopoulou L., Holt A. C., Medzhitov R., Flavell R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413:732-738.
- Alexopoulou L., Thomas V., Schnare M., Lobet Y., Anguita J., Schoen R. T., Medzhitov R., Fikrig E., Flavell R. A. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat Med* 2002; 8:878-884.
- Andrejeva J., Childs K. S., Young D. F., Carlos T. S., Stock N., Goodbourn S., Randall R. E. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:17264-17269.
- Anz D., Koelzer V. H., Moder S., Thaler R., Schwerd T., Lahl K., Sparwasser T., Besch R., Poeck H., Hornung V., Hartmann G., Rothenfusser S., Bourquin C., Endres S. Immunostimulatory RNA blocks suppression by regulatory T cells. *J Immunol* 2009; in press.
- Banchereau J., Steinman R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-252.
- Bangs S. C., Baban D., Cattan H. J., Li C. K., McMichael A. J., Xu X. N. Human CD4+ memory T cells are preferential targets for bystander activation and apoptosis. *J Immunol* 2009; 182:1962-1971.
- Bangs S. C., McMichael A. J., Xu X. N. Bystander T cell activation--implications for HIV infection and other diseases. *Trends Immunol* 2006; 27:518-524.
- Barchet W., Wimmenauer V., Schlee M., Hartmann G. Accessing the therapeutic potential of immunostimulatory nucleic acids. *Curr Opin Immunol* 2008; 20:389-395.
- Bates G. J., Fox S. B., Han C., Leek R. D., Garcia J. F., Harris A. L., Banham A. H. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* 2006; 24:5373-5380.
- Bath-Hextall F., Bong J., Perkins W., Williams H. Interventions for basal cell carcinoma of the skin: systematic review. *BMJ* 2004; 329:705.
- Bekeredjian-Ding I. B., Wagner M., Hornung V., Giese T., Schnurr M., Endres S., Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. *J Immunol* 2005; 174:4043-4050.
- Bekeredjian-Ding I., Roth S. I., Gilles S., Giese T., Ablasser A., Hornung V., Endres S., Hartmann G. T cell-independent, TLR-induced IL-12p70 production in primary human monocytes. *J Immunol* 2006; 176:7438-7446.
- Berger M., Ablasser A., Kim S., Bekeredjian-Ding I., Giese T., Endres S., Hornung V., Hartmann G. TLR8-driven IL-12-dependent reciprocal and synergistic activation of

- NK cells and monocytes by immunostimulatory RNA. *J Immunother* 2009; 32:262-271.
- Bettelli E., Korn T., Oukka M., Kuchroo V. K. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008; 453:1051-1057.
- Bieback K., Lien E., Klagge I. M., Avota E., Schneider-Schaulies J., Duprex W. P., Wagner H., Kirschning C. J., Ter Meulen V., Schneider-Schaulies S. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol* 2002; 76:8729-8736.
- Blanca I. R., Bere E. W., Young H. A., Ortaldo J. R. Human B cell activation by autologous NK cells is regulated by CD40-CD40 ligand interaction: role of memory B cells and CD5+ B cells. *J Immunol* 2001; 167:6132-6139.
- Borg C., Jalil A., Laderach D., Maruyama K., Wakasugi H., Charrier S., Ryffel B., Cambi A., Figdor C., Vainchenker W., Galy A., Caignard A., Zitvogel L. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* 2004; 104:3267-3275.
- Borg C., Terme M., Taieb J., Menard C., Flament C., Robert C., Maruyama K., Wakasugi H., Angevin E., Thielemans K., Le Cesne A., Chung-Scott V., Lazar V., Tchou I., Crepineau F., Lemoine F., Bernard J., Fletcher J. A., Turhan A., Blay J. Y., Spatz A., Emile J. F., Heinrich M. C., Mecheri S., Tursz T., Zitvogel L. Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. *J Clin Invest* 2004; 114:379-388.
- Bourquin C., Anz D., Zwioerek K., Lanz A. L., Fuchs S., Weigel S., Wurzenberger C., von der Borch P., Golic M., Moder S., Winter G., Coester C., Endres S. Targeting CpG oligonucleotides to the lymph node by nanoparticles elicits efficient antitumoral immunity. *J Immunol* 2008; 181:2990-2998.
- Bourquin C., Schmidt L., Hornung V., Wurzenberger C., Anz D., Sandholzer N., Schreiber S., Voelkl A., Hartmann G., Endres S. Immunostimulatory RNA oligonucleotides trigger an antigen-specific cytotoxic T- cell and IgG2a response. *Blood* 2007; 109:2953-60.
- Bourquin C., Schmidt L., Lanz A.-L., Storch B., Wurzenberger C., Anz D., Sandholzer N., Mocikat R., Berger M., Poeck H., Hartmann G., Hornung V., Endres S. Immunostimulatory RNA oligonucleotides induce an effective antitumoral NK- cell response through the Toll- like receptor 7. *J Immunol* 2009; 183:6078-86.
- Bourquin C., Schreiber S., Beck S., Hartmann G., Endres S. Immunotherapy with dendritic cells and CpG oligonucleotides can be combined with chemotherapy without loss of efficacy in a mouse model of colon cancer. *Int J Cancer* 2006; 118:2790-2795.
- Bromberg J. F., Horvath C. M., Wen Z., Schreiber R. D., Darnell J. E., Jr. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:7673-7678.
- Broomfield S. A., van der Most R. G., Prosser A. C., Mahendran S., Tovey M. G., Smyth M. J., Robinson B. W., Currie A. J. Locally administered TLR7 agonists drive systemic antitumor immune responses that are enhanced by anti-CD40 immunotherapy. *J Immunol* 2009; 182:5217-5224.
- Brunda M. J., Luistro L., Warriar R. R., Wright R. B., Hubbard B. R., Murphy M., Wolf S. F., Gately M. K. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med* 1993; 178:1223-1230.
- Brunner C., Seiderer J., Schlamp A., Bidlingmaier M., Eigler A., Haimerl W., Lehr H. A., Krieg A. M., Hartmann G., Endres S. Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J Immunol*. 2000; 11:6278-86.
- Bryceson Y. T., March M. E., Ljunggren H. G., Long E. O. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 2006; 214:73-91.
- Burnet F. M. Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant Rev* 1971; 7:3-25.
- Burnet F. M. Cancer: a biological approach. III Viruses associated with neoplastic conditions. IV Practical applications. *Br. Med. J* 1957; 841-847.
- Carter P. J. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:343-357.

- Chang C. C., Campoli M., Ferrone S. Classical and nonclassical HLA class I antigen and NK Cell-activating ligand changes in malignant cells: current challenges and future directions. *Adv Cancer Res* 2005; 93:189-234.
- Chu R. S., Targoni O. S., Krieg A. M., Lehmann P. V., Harding C. V. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 1997; 186:1623-1631.
- Coca S., Perez-Piqueras J., Martinez D., Colmenarejo A., Saez M. A., Vallejo C., Martos J. A., Moreno M. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1997; 79:2320-2328.
- Cohen P. A., Peng L., Plautz G. E., Kim J. A., Weng D. E., Shu S. CD4+ T cells in adoptive immunotherapy and the indirect mechanism of tumor rejection. *Crit Rev Immunol* 2000; 20:17-56.
- Cooper C. L., Davis H. L., Morris M. L., Efler S. M., Adhami M. A., Krieg A. M., Cameron D. W., Heathcote J. CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. *J Clin Immunol* 2004; 24:693-701.
- Cubillos-Ruiz J. R., Engle X., Scarlett U. K., Martinez D., Barber A., Elgueta R., Wang L., Nesbeth Y., Durant Y., Gewirtz A. T., Sentman C. L., Kedl R., Conejo-Garcia J. R. Polyethylenimine-based siRNA nanocomplexes reprogram tumor-associated dendritic cells via TLR5 to elicit therapeutic antitumor immunity. *J Clin Invest* 2009; 119:2231-2244.
- Dazzi F., Szydlo R. M., Cross N. C., Craddock C., Kaeda J., Kanfer E., Cwynarski K., Olavarria E., Yong A., Apperley J. F., Goldman J. M. Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96:2712-2716.
- Diebold S. S., Kaisho T., Hemmi H., Akira S., Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004; 303:1529-1531.
- Disis M. L., Bernhard H., Jaffee E. M. Use of tumour-responsive T cells as cancer treatment. *Lancet* 2009; 373:673-683.
- Dudley M. E., Wunderlich J. R., Yang J. C., Sherry R. M., Topalian S. L., Restifo N. P., Royal R. E., Kammula U., White D. E., Mavroukakis S. A., Rogers L. J., Gracia G. J., Jones S. A., Mangiameli D. P., Pelletier M. M., Gea-Banacloche J., Robinson M. R., Berman D. M., Filie A. C., Abati A., Rosenberg S. A. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2005; 23:2346-2357.
- Dumitru C. D., Antonyamy M. A., Gorski K. S., Johnson D. D., Reddy L. G., Lutterman J. L., Piri M. M., Proksch J., McGurran S. M., Egging E. A., Cochran F. R., Lipson K. E., Tomai M. A., Gullikson G. W. NK1.1+ cells mediate the antitumor effects of a dual Toll-like receptor 7/8 agonist in the disseminated B16-F10 melanoma model. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58:575-587.
- Dunn G. P., Bruce A. T., Ikeda H., Old L. J., Schreiber R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3:991-998.
- Dunn G. P., Koebel C. M., Schreiber R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:836-848.
- Durdik J. M., Beck B. N., Clark E. A., Henney C. S. Characterization of a lymphoma cell variant selectively resistant to natural killer cells. *J Immunol* 1980; 125:683-688.
- Edwards L., Ferenczy A., Eron L., Baker D., Owens M. L., Fox T. L., Hougham A. J., Schmitt K. A. Self-administered topical 5% imiquimod cream for external anogenital warts. HPV Study Group. Human PapillomaVirus. *Arch Dermatol* 1998; 134:25-30.
- Ehrlich P., Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneeskde* 1909; 5:273-290.
- Fallarino F., Uyttenhove C., Boon T., Gajewski T. F. Endogenous IL-12 is necessary for rejection of P815 tumor variants in vivo. *J Immunol* 1996; 156:1095-1100.

- Fernandez N. C., Lozier A., Flament C., Ricciardi-Castagnoli P., Bellet D., Suter M., Perricaudet M., Tursz T., Maraskovsky E., Zitvogel L. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 1999; 5:405-411.
- Galon J., Costes A., Sanchez-Cabo F., Kirilovsky A., Mlecnik B., Lagorce-Pages C., Tosolini M., Camus M., Berger A., Wind P., Zinzindohoue F., Bruneval P., Cugnenc P. H., Trajanoski Z., Fridman W. H., Pages F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313:1960-1964.
- Gao Q., Qiu S. J., Fan J., Zhou J., Wang X. Y., Xiao Y. S., Xu Y., Li Y. W., Tang Z. Y. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 2007; 25:2586-2593.
- Ghiringhelli F., Menard C., Terme M., Flament C., Taieb J., Chaput N., Puig P. E., Novault S., Escudier B., Vivier E., Lecesne A., Robert C., Blay J. Y., Bernard J., Caillat-Zucman S., Freitas A., Tursz T., Wagner-Ballon O., Capron C., Vainchencker W., Martin F., Zitvogel L. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 2005; 202:1075-1085.
- Ghose T., Guclu A., Tai J., Mammen M., Norvell S. T. Immunoprophylaxis and immunotherapy of EL4 lymphoma. *Eur J Cancer* 1977; 13:925-935.
- Gitlin L., Barchet W., Gilfillan S., Cella M., Beutler B., Flavell R. A., Diamond M. S., Colonna M. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:8459-8464.
- Glas R., Franksson L., Une C., Eloranta M. L., Ohlen C., Orn A., Karre K. Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype. An adaptive component of NK cell-mediated responses. *J Exp Med* 2000; 191:129-138.
- Gorski K. S., Waller E. L., Bjornton-Severson J., Hanten J. A., Riter C. L., Kieper W. C., Gorden K. B., Miller J. S., Vasilakos J. P., Tomai M. A., Alkan S. S. Distinct indirect pathways govern human NK-cell activation by TLR-7 and TLR-8 agonists. *Int Immunol* 2006; 18:1115-1126.
- Granucci F., Zanoni I., Pavelka N., Van Dommelen S. L., Andoniou C. E., Belardelli F., Degli Esposti M. A., Ricciardi-Castagnoli P. A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation. *J Exp Med* 2004; 200:287-295.
- Greten T. F., Jaffee E. M. Cancer vaccines. *J Clin Oncol* 1999; 17:1047-1060.
- Haas T., Metzger J., Schmitz F., Heit A., Muller T., Latz E., Wagner H. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity* 2008; 28:315-323.
- Halperin S. A., Van Nest G., Smith B., Abtahi S., Whiley H., Eiden J. J. A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant. *Vaccine* 2003; 21:2461-2467.
- Hamm S., Heit A., Koffler M., Huster K. M., Akira S., Busch D. H., Wagner H., Bauer S. Immunostimulatory RNA is a potent inducer of antigen-specific cytotoxic and humoral immune response in vivo. *Int Immunol* 2007; 19:297-304.
- Hart O. M., Athie-Morales V., O'Connor G. M., Gardiner C. M. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *J Immunol* 2005; 175:1636-1642.
- Hasan U., Chaffois C., Gaillard C., Saulnier V., Merck E., Tancredi S., Guet C., Briere F., Vlach J., Lebecque S., Trinchieri G., Bates E. E. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* 2005; 174:2942-2950.

- Hayashi F., Smith K. D., Ozinsky A., Hawn T. R., Yi E. C., Goodlett D. R., Eng J. K., Akira S., Underhill D. M., Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410:1099-1103.
- Heckelsmiller K., Beck S., Rall K., Sipos B., Schlamp A., Tuma E., Rothenfusser S., Endres S., Hartmann G. Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *Eur J Immunol* 2002; 32:3235-3245.
- Heckelsmiller K., Rall K., Beck S., Schlamp A., Seiderer J., Jahrsdorfer B., Krug A., Rothenfusser S., Endres S., Hartmann G. Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *J Immunol* 2002; 169:3892-3899.
- Heil F., Hemmi H., Hochrein H., Ampenberger F., Kirschning C., Akira S., Lipford G., Wagner H., Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303:1526-1529.
- Hemmer B., Vergelli M., Gran B., Ling N., Conlon P., Pinilla C., Houghten R., McFarland H. F., Martin R. Predictable TCR antigen recognition based on peptide scans leads to the identification of agonist ligands with no sequence homology. *J Immunol* 1998; 160:3631-3636.
- Hemmi H., Kaisho T., Takeuchi O., Sato S., Sanjo H., Hoshino K., Horiuchi T., Tomizawa H., Takeda K., Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002; 3:196-200.
- Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408:740-745.
- Hopkins P. A., Srisakandan S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol* 2005; 140:395-407.
- Hornung V., Ellegast J., Kim S., Brzozka K., Jung A., Kato H., Poeck H., Akira S., Conzelmann K. K., Schlee M., Endres S., Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006; 314:994-997.
- Hornung V., Guenther-Biller M., Bourquin C., Ablasser A., Schlee M., Uematsu S., Noronha A., Manoharan M., Akira S., de Fougères A., Endres S., Hartmann G. Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005; 11:263-270.
- Hornung V., Rothenfusser S., Britsch S., Krug A., Jahrsdorfer B., Giese T., Endres S., Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168:4531-4537.
- Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Ogawa T., Takeda Y., Takeda K., Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; 162:3749-3752.
- Huang B., Pan P. Y., Li Q., Sato A. I., Levy D. E., Bromberg J., Divino C. M., Chen S. H. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* 2006; 66:1123-1131.
- Igney F., Krammer P. Tumor counterattack: Fact or fiction?. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54:1127-1136.
- Ikeda H., Chamoto K., Tsuji T., Suzuki Y., Wakita D., Takeshima T., Nishimura T. The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy. *Cancer Sci* 2004; 95:697-703.
- Iwasaki A., Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5:987-995.
- Kadowaki N., Ho S., Antonenko S., Malefyt R. W., Kastelein R. A., Bazan F., Liu Y. J. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194:863-869.



- Kamath A. T., Sheasby C. E., Tough D. F. Dendritic cells and NK cells stimulate bystander T cell activation in response to TLR agonists through secretion of IFN-alpha beta and IFN-gamma. *J Immunol* 2005; 174:767-776.
- Kanneganti T. D., Body-Malapel M., Amer A., Park J. H., Whitfield J., Franchi L., Taraporewala Z. F., Miller D., Patton J. T., Inohara N., Nunez G. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem* 2006; 281:36560-36568.
- Katze M. G., Wambach M., Wong M. L., Garfinkel M., Meurs E., Chong K., Williams B. R., Hovanessian A. G., Barber G. N. Functional expression and RNA binding analysis of the interferon-induced, double-stranded RNA-activated, 68,000-Mr protein kinase in a cell-free system. *Mol Cell Biol* 1991; 11:5497-5505.
- Kawai T., Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143:1-20.
- Kerkmann M., Lochmann D., Weyermann J., Marschner A., Poeck H., Wagner M., Battiany J., Zimmer A., Endres S., Hartmann G. Immunostimulatory properties of CpG-oligonucleotides are enhanced by the use of protamine nanoparticles. *Oligonucleotides* 2006; 16:313-322.
- Khader S. A., Bell G. K., Pearl J. E., Fountain J. J., Rangel-Moreno J., Cilley G. E., Shen F., Eaton S. M., Gaffen S. L., Swain S. L., Locksley R. M., Haynes L., Randall T. D., Cooper A. M. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol* 2007; 8:369-377.
- Kim M. H., Kitson R. P., Albertsson P., Nannmark U., Basse P. H., Kuppen P. J., Hokland M. E., Goldfarb R. H. Secreted and membrane-associated matrix metalloproteinases of IL-2-activated NK cells and their inhibitors. *J Immunol* 2000; 164:5883-5889.
- Kim R., Emi M., Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007; 121:1-14.
- Kim S. K., Ragupathi G., Musselli C., Choi S. J., Park Y. S., Livingston P. O. Comparison of the effect of different immunological adjuvants on the antibody and T-cell response to immunization with MUC1-KLH and GD3-KLH conjugate cancer vaccines. *Vaccine* 1999; 18:597-603.
- Koh C. Y., Blazar B. R., George T., Welniak L. A., Capitini C. M., Raziuddin A., Murphy W. J., Bennett M. Augmentation of antitumor effects by NK cell inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo. *Blood* 2001; 97:3132-3137.
- Krieg A. M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:709-760.
- Krieg A. M. Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene* 2008; 27:161-167.
- Krieg A. M., Love-Homan L., Yi A. K., Harty J. T. CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to Listeria monocytogenes challenge. *J Immunol* 1998; 161:2428-2434.
- Krug A., Towarowski A., Britsch S., Rothenfusser S., Hornung V., Bals R., Giese T., Engelmann H., Endres S., Krieg A. M., Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 2001; 31:3026-3037.
- Kurt-Jones E. A., Popova L., Kwinn L., Haynes L. M., Jones L. P., Tripp R. A., Walsh E. E., Freeman M. W., Golenbock D. T., Anderson L. J., Finberg R. W. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 2000; 1:398-401.
- Lan T., Kandimalla E. R., Yu D., Bhagat L., Li Y., Wang D., Zhu F., Tang J. X., Putta M. R., Cong Y., Trombino A. F., Sullivan T., Agrawal S. Stabilized immune modulatory RNA compounds as agonists of Toll-like receptors 7 and 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:13750-13755.

- Langowski J. L., Zhang X., Wu L., Mattson J. D., Chen T., Smith K., Basham B., McClanahan T., Kastelein R. A., Oft M. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 2006; 442:461-465.
- Lauzon N. M., Mian F., MacKenzie R., Ashkar A. A. The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cell Immunol* 2006; 241:102-112.
- Lee M. S., Kim Y. J. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem* 2007; 76:447-480.
- Lemaitre B. The road to Toll. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:521-527.
- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J. M., Hoffmann J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86:973-983.
- Lipford G. B., Bauer M., Blank C., Reiter R., Wagner H., Heeg K. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur J Immunol* 1997; 27:2340-2344.
- Lokhorst H. M., Schattenberg A., Cornelissen J. J., van Oers M. H., Fibbe W., Russell I., Donk N. W., Verdonck L. F. Donor lymphocyte infusions for relapsed multiple myeloma after allogeneic stem-cell transplantation: predictive factors for response and long-term outcome. *J Clin Oncol* 2000; 18:3031-3037.
- Lonsdorf A. S., Kuekrek H., Stern B. V., Boehm B. O., Lehmann P. V., Tary-Lehmann M. Intratumor CpG-oligodeoxynucleotide injection induces protective antitumor T cell immunity. *J Immunol* 2003; 171:3941-3946.
- Lucas M., Schachterle W., Oberle K., Aichele P., Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 2007; 26:503-517.
- Lund J. M., Alexopoulou L., Sato A., Karow M., Adams N. C., Gale N. W., Iwasaki A., Flavell R. A. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:5598-5603.
- Luster A. D., Leder P. IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo. *J Exp Med* 1993; 178:1057-1065.
- Makki A., Weidt G., Blachere N. E., Lefrancois L., Srivastava P. K. Immunization against a dominant tumor antigen abrogates immunogenicity of the tumor. *Cancer Immunol* 2002; 2:4.
- Maloy K. J., Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001; 2:816-822.
- Martinez J., Huang X., Yang Y. Direct action of type I IFN on NK cells is required for their activation in response to vaccinia viral infection in vivo. *J Immunol* 2008; 180:1592-1597.
- Medzhitov R., Janeway C. A., Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002; 296:298-300.
- Medzhitov R., Janeway C., Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 2000; 8:452-456.
- Meng R. D., El-Deiry W. S. p53-independent upregulation of KILLER/DR5 TRAIL receptor expression by glucocorticoids and interferon-gamma. *Exp Cell Res* 2001; 262:154-169.
- Miconnet I., Koenig S., Speiser D., Krieg A., Guillaume P., Cerottini J. C., Romero P. CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide. *J Immunol* 2002; 168:1212-1218.
- Molenkamp B. G., van Leeuwen P. A., Meijer S., Sluijter B. J., Wijnands P. G., Baars A., van den Eertwegh A. J., Scheper R. J., de Gruijl T. D. Intradermal CpG-B activates both plasmacytoid and myeloid dendritic cells in the sentinel lymph node of melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2007; 13:2961-2969.
- Movahedi K., Guillems M., Van den Bossche J., Van den Bergh R., Gysemans C., Beschin A., De Baetselier P., Van Ginderachter J. A. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 2008; 111:4233-4244.

- Nanni P., Nicoletti G., De Giovanni C., Landuzzi L., Di Carlo E., Cavallo F., Pupa S. M., Rossi I., Colombo M. P., Ricci C., Astolfi A., Musiani P., Forni G., Lollini P. L. Combined allogeneic tumor cell vaccination and systemic interleukin 12 prevents mammary carcinogenesis in HER-2/neu transgenic mice. *J Exp Med* 2001; 194:1195-1205.
- Napolitani G., Rinaldi A., Berton F., Sallusto F., Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 2005; 6:769-776.
- Neri S., Mariani E., Meneghetti A., Cattini L., Facchini A. Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8:1131-1135.
- Netea M. G., Suttmüller R., Hermann C., Van der Graaf C. A., Van der Meer J. W., van Krieken J. H., Hartung T., Adema G., Kullberg B. J. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 172:3712-3718.
- Netea M. G., Van der Graaf C., Van der Meer J. W., Kullberg B. J. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:672-676.
- Nguyen K. B., Salazar-Mather T. P., Dalod M. Y., Van Deusen J. B., Wei X. Q., Liew F. Y., Caligiuri M. A., Durbin J. E., Biron C. A. Coordinated and distinct roles for IFN- $\alpha$   $\beta$ , IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol* 2002; 169:4279-4287.
- Nishikawa H., Kato T., Tawara I., Ikeda H., Kuribayashi K., Allen P. M., Schreiber R. D., Old L. J., Shiku H. IFN- $\gamma$  controls the generation/activation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in antitumor immune response. *J Immunol* 2005; 175:4433-4440.
- Noguchi Y., Jungbluth A., Richards E. C., Old L. J. Effect of interleukin 12 on tumor induction by 3-methylcholanthrene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:11798-11801.
- Oliveira A. C., Peixoto J. R., de Arruda L. B., Campos M. A., Gazzinelli R. T., Golenbock D. T., Akira S., Previato J. O., Mendonça-Previato L., Nobrega A., Bellio M. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol* 2004; 173:5688-5696.
- Ostrand-Rosenberg S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18:11-18.
- Ostrand-Rosenberg S., Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* 2009; 182:4499-4506.
- Ozinsky A., Underhill D. M., Fontenot J. D., Hajjar A. M., Smith K. D., Wilson C. B., Schroeder L., Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:13766-13771.
- Pages F., Berger A., Camus M., Sanchez-Cabo F., Costes A., Molitor R., Mlecnik B., Kirilovsky A., Nilsson M., Damotte D., Meatchi T., Bruneval P., Cugnenc P. H., Trajanoski Z., Fridman W. H., Galon J. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:2654-2666.
- Parkhurst M. R., Salgaller M. L., Southwood S., Robbins P. F., Sette A., Rosenberg S. A., Kawakami Y. Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A\*0201-binding residues. *J Immunol* 1996; 157:2539-2548.
- Peng G., Guo Z., Kiniwa Y., Voo K. S., Peng W., Fu T., Wang D. Y., Li Y., Wang H. Y., Wang R. F. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Science* 2005; 309:1380-1384.
- Pichlmair A., Schulz O., Tan C. P., Naslund T. I., Liljestrom P., Weber F., Reis e Sousa C. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 2006; 314:997-1001.

- Pippig D. A., Hellmuth J. C., Cui S., Kirchhofer A., Lammens K., Lammens A., Schmidt A., Rothenfusser S., Hopfner K. P. The regulatory domain of the RIG-I family ATPase LGP2 senses double-stranded RNA. *Nucleic Acids Res* 2009; 37:2014-2025.
- Poeck H., Besch R., Maihoefer C., Renn M., Tormo D., Morskaya S. S., Kirschnek S., Gaffal E., Landsberg J., Hellmuth J., Schmidt A., Anz D., Bscheider M., Schwerdt T., Berking C., Bourquin C., Kalinke U., Kremmer E., Kato H., Akira S., Meyers R., Hacker G., Neuenhahn M., Busch D., Ruland J., Rothenfusser S., Prinz M., Hornung V., Endres S., Tuting T., Hartmann G. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat Med* 2008; 14:1256-1263.
- Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M. Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282:2085-2088.
- Qian C., Jiang X., An H., Yu Y., Guo Z., Liu S., Xu H., Cao X. TLR agonists promote ERK-mediated preferential IL-10 production of regulatory dendritic cells (diffDCs), leading to NK-cell activation. *Blood* 2006; 108:2307-2315.
- Reiter M. J., Testerman T. L., Miller R. L., Weeks C. E., Tomai M. A. Cytokine induction in mice by the immunomodulator imiquimod. *J Leukoc Biol* 1994; 55:234-240.
- Rodella L., Zamai L., Rezzani R., Artico M., Peri G., Falconi M., Facchini A., Pelusi G., Vitale M. Interleukin 2 and interleukin 15 differentially predispose natural killer cells to apoptosis mediated by endothelial and tumour cells. *Br J Haematol* 2001; 115:442-450.
- Roman M., Martin-Orozco E., Goodman J. S., Nguyen M. D., Sato Y., Ronaghy A., Kornbluth R. S., Richman D. D., Carson D. A., Raz E. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med* 1997; 3:849-854.
- Rothenfusser S., Hornung V., Ayyoub M., Britsch S., Towarowski A., Krug A., Sarris A., Lubenow N., Speiser D., Endres S., Hartmann G. CpG-A and CpG-B oligonucleotides differentially enhance human peptide-specific primary and memory CD8+ T-cell responses in vitro. *Blood* 2004; 103:2162-2169.
- Salio M., Palmowski M. J., Atzberger A., Hermans I. F., Cerundolo V. CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens. *J Exp Med* 2004; 199:567-579.
- Sawaki J., Tsutsui H., Hayashi N., Yasuda K., Akira S., Tanizawa T., Nakanishi K. Type 1 cytokine/chemokine production by mouse NK cells following activation of their TLR/MyD88-mediated pathways. *Int Immunol* 2007; 19:311-320.
- Scheel B., Aulwurm S., Probst J., Stitz L., Hoerr I., Rammensee H. G., Weller M., Pascolo S. Therapeutic anti-tumor immunity triggered by injections of immunostimulating single-stranded RNA. *Eur J Immunol* 2006; 36:2807-2816.
- Scheel B., Braedel S., Probst J., Carralot J. P., Wagner H., Schild H., Jung G., Rammensee H. G., Pascolo S. Immunostimulating capacities of stabilized RNA molecules. *Eur J Immunol* 2004; 34:537-547.
- Schleicher U., Liese J., Knippertz I., Kurzmann C., Hesse A., Heit A., Fischer J. A., Weiss S., Kalinke U., Kunz S., Bogdan C. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. *J Exp Med* 2007; 204:893-906.
- Schon M. P., Schon M. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene* 2008; 27:190-199.
- Seder R. A., Paul W. E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:635-673.
- Selin L. K., Brehm M. A., Naumov Y. N., Cornberg M., Kim S. K., Clute S. C., Welsh R. M. Memory of mice and men: CD8+ T-cell cross-reactivity and heterologous immunity. *Immunol Rev* 2006; 211:164-181.

- Serafini P., Borrello I., Bronte V. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol* 2006; 16:53-65.
- Shahied L. S., Tang Y., Alpaugh R. K., Somer R., Greenspon D., Weiner L. M. Bispecific minibodies targeting HER2/neu and CD16 exhibit improved tumor lysis when placed in a divalent tumor antigen binding format. *J Biol Chem* 2004; 279:53907-53914.
- Sidky Y. A., Borden E. C., Weeks C. E., Reiter M. J., Hatcher J. F., Bryan G. T. Inhibition of murine tumor growth by an interferon-inducing imidazoquinolinamine. *Cancer Res* 1992; 52:3528-3533.
- Sivori S., Falco M., Della Chiesa M., Carlomagno S., Vitale M., Moretta L., Moretta A. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:10116-10121.
- Smiley S. T., King J. A., Hancock W. W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001; 167:2887-2894.
- Smith J. W., 2nd, Walker E. B., Fox B. A., Haley D., Wisner K. P., Doran T., Fisher B., Justice L., Wood W., Vetto J., Maecker H., Dols A., Meijer S., Hu H. M., Romero P., Alvord W. G., Urban W. J. Adjuvant immunization of HLA-A2-positive melanoma patients with a modified gp100 peptide induces peptide-specific CD8+ T-cell responses. *J Clin Oncol* 2003; 21:1562-1573.
- Smyth M. J., Swann J., Cretney E., Zerafa N., Yokoyama W. M., Hayakawa Y. NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J Exp Med* 2005; 202:583-588.
- Smyth M. J., Takeda K., Hayakawa Y., Peschon J. J., van den Brink M. R., Yagita H. Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* 2003; 18:1-6.
- Speiser D. E., Lienard D., Rufer N., Rubio-Godoy V., Rimoldi D., Lejeune F., Krieg A. M., Cerottini J. C., Romero P. Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest* 2005; 115:739-746.
- Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007; 13:139-145.
- Sutmoller R. P., Morgan M. E., Netea M. G., Grauer O., Adema G. J. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol* 2006; 27:387-393.
- Terme M., Ullrich E., Delahaye N. F., Chaput N., Zitvogel L. Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat Immunol* 2008; 9:486-494.
- Testi R., Phillips J. H., Lanier L. L. Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca<sup>++</sup>] and stimulation of protein kinase C. *J Immunol* 1989; 142:1854-1860.
- Thomas L., in *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States* (ed. Lawrence H.S.) 1959; 529-532.
- Toka F. N., Nfon C. K., Dawson H., Golde W. T. Accessory-cell-mediated activation of porcine NK cells by toll-like receptor 7 (TLR7) and TLR8 agonists. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16:866-878.
- Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:133-146.
- Trinchieri G., Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:179-190.
- Trujillo-Vargas C. M., Mayer K. D., Bickert T., Palmetshofer A., Grunewald S., Ramirez-Pineda J. R., Polte T., Hansen G., Wohlleben G., Erb K. J. Vaccinations with T-helper type 1 directing adjuvants have different suppressive effects on the development of allergen-induced T-helper type 2 responses. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:1003-1013.

- Underhill D. M., Ozinsky A., Smith K. D., Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:14459-14463.
- Urban-Klein B., Werth S., Abuharbeid S., Czubyko F., Aigner A. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Ther* 2005; 12:461-466.
- Vabulas R. M., Pircher H., Lipford G. B., Hacker H., Wagner H. CpG-DNA activates in vivo T cell epitope presenting dendritic cells to trigger protective antiviral cytotoxic T cell responses. *J Immunol* 2000; 164:2372-2378.
- van der Bruggen P., van den Eynde B. J. Processing and presentation of tumor antigens and vaccination strategies. *Curr Opin Immunol* 2006; 18:98-104.
- van der Most R. G., Himbeck R., Aarons S., Carter S. J., Larma I., Robinson C., Currie A., Lake R. A. Antitumor efficacy of the novel chemotherapeutic agent coramsine is potentiated by cotreatment with CpG-containing oligodeoxynucleotides. *J Immunother* 2006; 29:134-142.
- Vasilakos J. P., Smith R., Gibson S., Lindh J., Pederson L., Reiter M., Smith M., Tomai M. Adjuvant Activities of Immune Response Modifier R-848: Comparison with CpG ODN. *Cell Immunol* 2000; 204:64-74.
- Vivier E., Tomasello E., Baratin M., Walzer T., Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008; 9:503-510.
- Wang X. S., Sheng Z., Ruan Y. B., Guang Y., Yang M. L. CpG oligodeoxynucleotides inhibit tumor growth and reverse the immunosuppression caused by the therapy with 5-fluorouracil in murine hepatoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11:1220-1224.
- Weeratna R. D., McCluskie M. J., Xu Y., Davis H. L. CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine* 2000; 18:1755-1762.
- Weigel B. J., Rodeberg D. A., Krieg A. M., Blazar B. R. CpG oligodeoxynucleotides potentiate the antitumor effects of chemotherapy or tumor resection in an orthotopic murine model of rhabdomyosarcoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9:3105-3114.
- Werth S., Urban-Klein B., Dai L., Hobel S., Grzelinski M., Bakowsky U., Czubyko F., Aigner A. A low molecular weight fraction of polyethylenimine (PEI) displays increased transfection efficiency of DNA and siRNA in fresh or lyophilized complexes. *J Control Release* 2006; 112:257-270.
- West A. P., Koblansky A. A., Ghosh S. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006; 22:409-437.
- Westwood A., Elvin S. J., Healey G. D., Williamson E. D., Eyles J. E. Immunological responses after immunisation of mice with microparticles containing antigen and single stranded RNA (polyuridylic acid). *Vaccine* 2006; 24:1736-1743.
- Wysocka M., Benoit B. M., Newton S., Azzoni L., Montaner L. J., Rook A. H. Enhancement of the host immune responses in cutaneous T-cell lymphoma by CpG oligodeoxynucleotides and IL-15. *Blood* 2004; 104:4142-4149.
- Yarovinsky F., Hieny S., Sher A. Recognition of *Toxoplasma gondii* by TLR11 prevents parasite-induced immunopathology. *J Immunol* 2008; 181:8478-8484.
- Yarovinsky F., Zhang D., Andersen J. F., Bannenberg G. L., Serhan C. N., Hayden M. S., Hieny S., Sutterwala F. S., Flavell R. A., Ghosh S., Sher A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 2005; 308:1626-1629.
- Yasuda K., Rutz M., Schlatter B., Metzger J., Lippa P. B., Schmitz F., Haas T., Heit A., Bauer S., Wagner H. CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal translocation of "natural" phosphodiester DNA. *Eur J Immunol* 2006; 36:431-436.
- Yasuda K., Yu P., Kirschning C. J., Schlatter B., Schmitz F., Heit A., Bauer S., Hochrein H., Wagner H. Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 2005; 174:6129-6136.
- Ye Z., Ting J. P. NLR, the nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing gene family. *Curr Opin Immunol* 2008; 20:3-9.

- 
- Yi A.K., Tuetken R., Redford T., Waldschmidt M., Kirsch J., Krieg A.M. CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol* 1998; 160 (10):4755-4761.
- Yoneyama M., Kikuchi M., Natsukawa T., Shinobu N., Imaizumi T., Miyagishi M., Taira K., Akira S., Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004; 5:730-737.
- Zanoni I., Foti M., Ricciardi-Castagnoli P., Granucci F. TLR-dependent activation stimuli associated with Th1 responses confer NK cell stimulatory capacity to mouse dendritic cells. *J Immunol* 2005; 175:286-292.
- Zhang D., Zhang G., Hayden M. S., Greenblatt M. B., Bussey C., Flavell R. A., Ghosh S. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; 303:1522-1526.
- Zimmermann S., Egeter O., Hausmann S., Lipford G. B., Rocken M., Wagner H., Heeg K. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* 1998; 160:3627-3630.
- Zingoni A., Sornasse T., Cocks B. G., Tanaka Y., Santoni A., Lanier L. L. Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol* 2004; 173:3716-3724.
- Zwioerek K., Bourquin C., Battiany J., Winter G., Endres S., Hartmann G., Coester C. Delivery by cationic gelatin nanoparticles strongly increases the immunostimulatory effects of CpG oligonucleotides. *Pharm Res* 2008; 25:551-562.

## 8. ANHANG

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

#### A

APC Allophycocyanin

#### B

BSA Bovines Serumalbumin

#### C

CARD Caspase-rekrutierende Domäne

CD *Cluster of differentiation*

CFA *Complete Freund's Adjuvant*

CFSE Carboxyfluoreszein Succinimidylester

CIITA MHC-II Transkriptionsaktivator

CpG Oligonukleotid mit Cytosin-Guanosin-Motiv

CTL Zytotoxische T-Lymphozyten

#### D

DC Dendritische Zelle

DNA Desoxyribonukleinsäure

DOTAP Dioleoyloxypropyl-Trimethylammonium-Methylsulfat

dsRNA Doppelsträngige RNA

#### E

EDTA Ethylendiamin-Tetraacetyl-Säure

ELISA *Enzyme-linked immunosorbent assay*

#### F

FACS *Fluorescence-activated cell sorting*

FasL Fas-Ligand

FCS Fetales Kälberserum

FITC Fluoreszein Isothiozyanat

#### G

GM-CSF *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*

#### H

HBSS *Hank's balanced saline solution*

HEPES N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfon-Säure

HET-E Protein aus *Podospira anserina*

HIV Humanes Immundefizienz-Virus

#### I

ICE IL-1 $\beta$ -*converting enzyme*

iE-DAP  $\gamma$ -D-Glutamyl-Meso-Diaminopimelinsäure

IFN Interferon

Ig Immunglobulin

I $\kappa$ B Inhibitor von  $\kappa$ B

IL Interleukin

IL-1-R Interleukin-1-Rezeptor

IPAF ICE-Proteasen-aktivierender Faktor



IPS-1	IFN- $\beta$ Promotor-Stimulator 1
IRAK	IL-1-R-assoziierte Kinase
IRF	IFN-regulierender Faktor
isRNA	Immunstimulatorische RNA
<b>L</b>	
LGP-2	Labor für Genetik und Physiologie 2
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucin-rich repeat</i>
<b>M</b>	
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mDC	Myeloide dendritische Zelle
MDA-5	<i>Melanoma differentiation associated gene 5</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cell</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MyD88	Myeloider Differenzierungsfaktor 88
<b>N</b>	
NACHT	Nukleosid-Triphosphatase-Domäne zusammengesetzt aus NAIP, CIITA, HET-E und TP1
NAD	NACHT-assoziierte Domäne
NAIP	Neuronales Apoptose-inhibierendes Protein
NALP	NACHT-, LRR- und Pyrin-Domänen-enthaltendes Protein
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor $\kappa$ B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
NLR	<i>NOD-like</i> -Rezeptor-Proteine
NOD	Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne
<b>O</b>	
ODN	Oligodesoxyribonukleotide
ORN	Oligoribonukleotide
OVA	Hühnerei-Ovalbumin
<b>P</b>	
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PRR	<i>Pattern-recognition</i> -Rezeptor
<b>R</b>	
RAG2	Rekombination-aktivierendes Gen 2
RICK	Rezeptor-interagierende Serin-Threonin Kinase
RIG-I	Retinsäure-induziertes Gen I
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

**S**

siRNA  
ssRNA

*Short-interfering RNA*  
*Single-stranded RNA*

**T**

TAK1  
TAB1/2/3  
TBK  
TGF- $\beta$   
Th  
TIR  
TIRAP  
TLR  
TNF  
TP1  
TRAF  
TRAM  
Treg  
TRIF

TGF- $\beta$ -aktivierte Kinase 1  
TAK-1-bindendes Protein 1/2/3  
*TRAF family member-associated* NF- $\kappa$ B-bindende Kinase  
*Tumour growth factor  $\beta$*   
T-Helfer  
Toll/IL-1-Rezeptor  
TIR-assoziiertes Protein  
*Toll-like*-Rezeptor  
Tumornekrosefaktor  
Telomerase-assoziiertes Protein  
TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor  
*TRIF-related adapter molecule*  
T-regulatorische Zelle  
*TIR- domain containing adapter inducing IFN- $\beta$*

**V**

VEGF  
VSV

*Vascular endothelial growth factor*  
*Vesicular stomatitis virus*

## 8.2 Publikationen

### Originalartikel

1. Bourquin C., **Schmidt L.**, Hornung V., Wurzenberger C., Anz D., Sandholzer N., Schreiber S., Voelkl A., Hartmann G., Endres S.  
Immunostimulatory RNA oligonucleotides trigger an antigen-specific cytotoxic T- cell and IgG2a response.  
*Blood* 2007; 109(7):2953-60. (JIF 10,896)
2. Bourquin C.\* , **Schmidt L.**\* , Lanz A.-L., Storch B., Wurzenberger C., Anz D., Sandholzer N., Mocikat R., Berger M., Poeck H., Hartmann G., Hornung V., Endres S.  
Immunostimulatory RNA oligonucleotides induce an effective antitumoral NK- cell response through the Toll- like receptor 7.  
*J Immunol* 2009; 183(10):6078-86.  
\* contributed equally

### Vorträge

1. Immunostimulatory ssRNA: Effects on lymphocytes and tumor therapy.  
*1<sup>st</sup> Annual Retreat, Graduiertenkolleg 1202, Frauenchiemsee, Deutschland, 2006.*

### Posterpräsentationen

1. **Schmidt L.**, Wurzenberger C., Hornung V., Sandholzer N., Schreiber S., Hartmann G., Endres S., Bourquin C.  
Short immunostimulatory RNA sequences induce production of Th1-type cytokines.  
*16. Europäischer Kongress für Immunologie, Paris, Frankreich, 2006.*
2. **Schmidt L.**, Lanz A.-L., Wurzenberger C., Storch B., Anz D., Sandholzer N., Endres S., Bourquin C.  
Immunostimulatory RNA oligonucleotides activate NK cells in vivo through the Toll-like receptor 7 in a DC-dependent manner.  
*3<sup>rd</sup> Tegernsee Conference on Immunotherapy of Cancer, Feldafing, Deutschland, 2009.*

3. Lanz A.-L., **Schmidt L.**, Wurzenberger C., Sandholzer N., Anz D., Storch B., Endres S., Bourquin C.

Immunostimulatory RNA oligonucleotides induce an efficient anti-tumor response through activated NK cells.

*3<sup>rd</sup> Tegernsee Conference on Immunotherapy of Cancer, Feldafing, Deutschland, 2009.*

### 8.3 Lebenslauf

#### Persönliche Daten

Name: Laura Schmidt  
Geburtsdatum: 30. Dezember 1982  
Geburtsort: Heidelberg  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: Ledig

#### Schulbildung

1989 bis 1993 Grundschole in Karlsfeld und Heidelberg  
1993 bis 1994 Elisabeth-von-Thadden Gymnasium Heidelberg  
1994 bis 2002 Louise-Schroeder Gymnasium München  
Schulabschluss Allgemeine Hochschulreife, Juni 2002, Endnote 1,2

#### Studium

WS 2002/03 Studium der Molekularen Biotechnologie an der TUM  
2003 bis 2009 Studium der Humanmedizin an der LMU München  
März 2005 Ärztliche Vorprüfung, Gesamtnote 2,0  
2005 bis 2009 Experimentelle Promotionsarbeit in der Abteilung für  
Klinische Pharmakologie (Leiter: Prof. Dr. S. Endres)  
2008 bis 2009 Praktisches Jahr am Sunnybrook Hospital, University of  
Toronto, Kanada, Klinikum Dritter Orden München,  
Medizinische Klinik und Poliklinik II Großhadern,  
Neurologische Klinik Großhadern, Klinikum der Universität  
München  
Mai 2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Endnote 1,5

#### Beruf

Seit August 2009 Assistenzärztin der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
Großhadern, Klinikum der Universität München (Direktor:  
Prof. Dr. B. Göke)

#### Stipendien

2005 bis 2006 Stipendiatin des Graduiertenkollegs 1202 „Oligonukleotide  
in Zellbiologie und Therapie“, gefördert durch die Deutsche  
Forschungsgemeinschaft

#### **8.4 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Stefan Endres für die Überlassung des interessanten Themas, für die persönliche und fachliche Unterstützung sowie für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in einer sehr engagierten Abteilung mit freundschaftlicher Arbeitsatmosphäre durchzuführen.

Ich bedanke mich herzlich bei PD Dr. Dr. Carole Bourquin für die hervorragende, immer erreichbare Betreuung. Ihre stetige Motivierung und Unterstützung haben entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Für die sehr gute methodische Einarbeitung danke ich besonders Frau Nadja Sandholzer, Frau Susanne Wenk und Frau Dr. Cornelia Wurzenberger. Für die tatkräftige Unterstützung bei dem Projekt möchte ich mich außerdem bedanken bei: Anna-Lisa Lanz, Dr. David Anz, Dr. Bettina Storch, Rosemarie Kiefl, Susanne Schreiber, Dr. Andreas Voelkl, Dr. Michael Berger, Dr. Hendrick Poeck, Prof. Veit Hornung und Prof. Gunther Hartmann.

Ich bedanke mich bei den ehemaligen Mitdoktoranden Philip von der Borch, Simon Heidegger, Michaela Golic, Viktor Kölzer, Sarah Weigel und Raffael Thaler sowie bei allen aktuellen Doktoranden für die herzliche Zusammenarbeit.

Nicht zu letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie für ihre Unterstützung und Motivierung bedanken.